

(5)

WO0164214 - COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES USING TOPOISOMERASE INHIBITORS - THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA**WO0164214 - COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES USING TOPOISOMERASE INHIBITORS**

[Right click link to bookmark]

Status: ● The examination is in progress
Status of the database as of: 11/08/2006

Most Recent Event: 22/02/2006 New entry: Renewal fee paid

Applicant(s): For all designated states
THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA
IRC Building, Room 331, 2194 Health Sciences Mall Vancouver,
British Columbia V6T 1Z3 / CA
[N/P]

Inventor(s): 01 / JACKSON, John, K.
540 West 29th Avenue
Vancouver, British Columbia V5Z 2H7 / CA
02 / BURT, Helen, M.
3182 West 28th Avenue
Vancouver, British Columbia V6L 1X5 / CA
03 / DORDUNOO, Stephen, K.
5039 Springhouse Circle
Baltimore, MD 21237 / US
[2003/09]

Representative(s): Gardner, Rebecca Katherine
Frank B. Dehn & Co. St Bride's House 10 Salisbury Square
London EC4Y 8JD / GB
[2002/49]

Application No., filing date: 01909384.8 28/02/2001
[2002/49]
WO2001CA00247

Priority No., dates: US20000185565P 28/02/2000
[2002/49]

Filing language: EN

Procedural language: EN

Publication: Type: A2
No.: EP1261337
Date: 07/09/2001
[2002/49]
Type:
No.: WO0164214
Date: 07/09/2001
[2002/49]

International search report: Date: 10/05/2002
Authority: EP

Classification:	international:	A61K31/4439, A61K31/357, A61K31/365, A61P29/00 [2002/49]
Designated Contracting States:	AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR [2002/49]	
Title	German	ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERWENDUNGEN ZUR BEHANDLUNG VON ENTZÜNDEUNGEN, MIT TOPOISOMERASEHEMMERN [2002/49]
	English	COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF INFLAMMATORY DISEASES USING TOPOISOMERASE INHIBITORS [2002/49]
	French	COMPOSITIONS ET METHODES DE TRAITEMENT DE MALADIES INFLAMMATOIRES [2002/49]
Application is treated in (/fax-nr)	MUNICH/(+49-89) 23994465	
Entry into regional phase:	26/09/2002	Designation fee(s) paid
	26/09/2002	Examination fee paid
	26/09/2002	National basic fee paid
Examination procedure:	26/09/2001	Request for preliminary examination filed International Preliminary Examination Authority: EP
	26/09/2002	Amendment under R.86(2) (claims and/or description)
	26/09/2002	Request for examination was made [2002/49]
	15/10/2004	Dispatch of examination report A.96(2), R.51 (2) (Time limit: M08)
	05/08/2005	Dispatch of communication that the application is deemed to be withdrawn, reason: A.96(3)
	14/10/2005	Reply to examination report
	14/10/2005	Fee for further processing A.121 paid
	14/10/2005	Request for further processing A.121 filed
	31/10/2005	Decision on request for further processing A.121: request accepted
Fees Paid:	Renewal fee A.86	
	26/02/2003	Renewal fee patent year 03
	12/02/2004	Renewal fee patent year 04
	14/02/2005	Renewal fee patent year 05
	14/02/2006	Renewal fee patent year 06
Cited in	International search [X] WO9962510 ↻	
	[X] WO0000238 ↻	
	[XP] US6191119 ↻	
	[XP] US6281223 ↻	
	[X] PITSILLIDES A A ET AL: "AMELIORATION BY MENADIONE OF THE EXPERIMENTAL CHRONIC IMMUNE ARTHRITIS IN THE RABBIT" CELL	

BIOCHEMISTRY AND FUNCTION, vol. 8, no. 4, 1990, pages 221-226, XP001037799 ISSN: 0263-6484

[X] FONTAGNE ET AL: "PROPRIETES INFLAMMATOIRES ET ANTIINFLAMMATOIRES DE DIVERSES SUBSTANCES OXYDANTES" ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THERAPIE, vol. 206, 1973, pages 242-252, XP001037778

[X] SLOBODA A E ET AL: "STUDIES OF THE EFFECT OF MITOXANTRONE ON ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN RATS" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 40, no. 2, 1986, pages 236-243, XP001025180 ISSN: 0090-1229

[X] NORBERG B ET AL: "EFFECTS ON BONE MARROW CELLS OF ORAL TREATMENT WITH PODOPHYLLOTOXIN DERIVATIVES IN RHEUMATOID ARTHRITIS" SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 14, no. 3, 1985, pages 271-275, XP001037739 ISSN: 0300-9742

[X] DUBOIS ET AL: "DE BEHANDELING VAN MULTIPLE SCLEROSE" TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 53, no. 20, 1997, pages 1382-1395, XP001037773

[X] VOISARD RAINER ET AL: "A prescreening system for potential antiproliferative agents: Implications for local treatment strategies of postangioplasty restenosis." INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, vol. 51, no. 1, 1995, pages 15-28, XP001037798 ISSN: 0167-5273

[X] LIU SHING-HWA ET AL: "Inhibition of inducible nitric oxide synthase by beta-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, no. 3, February 1999 (1999-02), pages 746-750, XP001087770 ISSN: 0007-1188

[X] KIMURA I ET AL: "MENAQUINONE VITAMIN K-2 THERAPY FOR BRONCHIAL ASTHMA PART 2 CLINICAL EFFECT OF MENAQUINONE ON BRONCHIAL ASTHMA" ACTA MEDICA OKAYAMA, vol. 29, no. 2, 1975, pages 127-136, XP001037714 ISSN: 0386-300X

[A] FROSCH P J ET AL: "ALLERGIC REACTIONS OF THE IMMEDIATE TYPE TO THE HAIR DYE HENNA" ALLERGOLOGIE, vol. 9, no. 8, 1986, pages 351-353, XP001037738 ISSN: 0344-5062

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-525243
(P2003-525243A)

(43) 公表日 平成15年8月26日 (2003.8.26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 F 2/06		A 6 1 F 2/06	4 C 0 8 1
A 6 1 K 31/122		A 6 1 K 31/122	4 C 0 8 4
31/365		31/365	4 C 0 8 6
31/4375		31/4375	4 C 0 9 7
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-563111(P2001-563111)
 (86) (22) 出願日 平成13年2月28日(2001.2.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年8月28日(2002.8.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA01/00247
 (87) 国際公開番号 WO01/064214
 (87) 国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)
 (31) 優先権主張番号 60/185,565
 (32) 優先日 平成12年2月28日(2000.2.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CA, JP, US

(71) 出願人 ザ ユニバーシティ オブ ブリティッシュ
 ユ コロンビア
 The University of B
 ritish Columbia
 カナダ国 V6T 1Z3 ブリティッシュ
 ユ コロンビア バンクーバー ヘルス
 サイエンスズ モール 2194 アイアー
 ルシー 331 インダストリー リエゾン
 オフィス

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患の治療のための組成物及び方法

(57) 【要約】

トポイソメラーゼインヒビターは、関節炎、再狭窄、外科的癒着および他の疾患を含む炎症性疾患の治療に有用である。トポイソメラーゼインヒビターの制御放出（徐放性）ポリマー調製物は、この用途に特に適している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 炎症性疾患が再狭窄または乾癬であり、トポイソメラーゼインヒビターがカンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合の、炎症性疾患の治療用医薬品の製造におけるトポイソメラーゼインヒビターの使用。

【請求項2】 医薬品がリウマチ様関節炎の治療用であり、トポイソメラーゼインヒビターがブルムバギン、ローソンまたはジュグロンではない、請求項1記載の使用。

【請求項3】 トポイソメラーゼインヒビターが、カンプトテシンならびにその類似体および誘導体；エピポドフィロトキシンならびにその類似体および誘導体；アントラサイクリンならびにその類似体および誘導体；1,2ナフトキノンならびにその類似体および誘導体；ならびにメナジオンよりなる群から選択される、請求項2記載の使用。

【請求項4】 医薬品が、結晶誘導性関節炎；骨関節炎；非リウマチ様炎症性関節炎；混合型結合組織病；シェーグレン症候群；強直性脊椎炎；ベーチェット症候群；サルコイドーシス；乾癬；湿疹；炎症性腸疾患；慢性炎症性肺疾患；神経疾患；および多発性硬化症よりなる群から選択される、好中球が関与する炎症性疾患の治療用である、請求項1記載の使用。

【請求項5】 トポイソメラーゼインヒビターが、カンプトテシンならびにその類似体および誘導体；エピポドフィロトキシンならびにその誘導体；アントラサイクリンならびにその類似体および誘導体；1,2ナフトキノンならびにその類似体および誘導体；ならびに1,4ナフトキノンならびにその類似体および誘導体よりなる群から選択される、請求項4記載の使用。

【請求項6】 医薬品が、外科的癒着の治療用である、請求項1記載の使用。

【請求項7】 トポイソメラーゼインヒビターは、カンプトテシンならびにその類似体および誘導体；エピポドフィロトキシンならびにその類似体および誘導体；アントラサイクリンならびにその類似体および誘導体；1,2ナフトキノンならびにその類似体および誘導体；ならびに1,4ナフトキノンよりなる群から選

択される、請求項6記載の使用。

【請求項8】 医薬品が再狭窄の治療用であり、トポイソメラーゼインヒビターが、プルムバギン、ローソンまたはジュグロンではない、請求項1記載の使用。

【請求項9】 トポイソメラーゼインヒビターは、エピポドフィロトキシンならびにその類似体および誘導体；アントラサイクリンならびにその類似体および誘導体；1,2ナフトキノンならびにその類似体および誘導体；ならびにメナジオンよりなる群から選択される、請求項8記載の使用。

【請求項10】 医薬品は、トポイソメラーゼインヒビターを制御放出するように作製されたポリマー剤形を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の使用。

【請求項11】 トポイソメラーゼインヒビターが、医療器具の中または上に含まれる、請求項1～9のいずれか1項に記載の使用。

【請求項12】 医療器具が、再狭窄の治療用であり、トポイソメラーゼインヒビターが、カンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合の、トポイソメラーゼインヒビターを含む医療器具。

【請求項13】 スtent、stent移植片、矯正器具、血管移植片、または留置カテーテルである、請求項12記載の医療器具。

【請求項14】 器具上にトポイソメラーゼインヒビターが被覆されたものである、請求項12または13記載の医療器具。

【請求項15】 炎症性疾患が再狭窄または乾癬であり、トポイソメラーゼインヒビターがカンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合に、治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビターを患者に投与するか、または治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビターを含む医療器具を患者に移植することを含む、患者の炎症性疾患の治療法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

世界中で炎症性疾患を治療するための現在のコストは莫大なものである。これらの疾患は、数週間から数ヶ月（慢性炎症）続き、長期にわたり費用のかかる医療を必要とすることが多い。慢性炎症は、活動性炎症、組織破壊、および治癒の予兆が同時に進行する長期持続性の炎症として説明される（R.S. Cotran, V. KumarおよびS.L. RobbinsによるRobbins Pathological Basis of Disease, ダブリュー・ビー・サンダーズ社（W.B. Saunders Co.）、p75, 1989を参照）。時に炎症性疾患は急性の発症（患者に疼痛と経済的喪失を与える）として開始し、慢性の炎症症状に進行し、以後患者の精神的および身体的健康を衰弱させる。これらの重大な結果にもかかわらず、慢性炎症性疾患（例えば、関節炎、再狭窄、乾癬、多発性硬化症、外科的癒着、炎症性腸疾患、および慢性炎症性肺疾患）の患者に対して、治療法がほとんど無いことが多い。患者は、疾患の症状を緩和させるためにしばしばステロイドまたは非ステロイド抗炎症剤で一時的に治療を受けるが、これらの治療法は、長期的利点はほとんど無く、使い過ぎると深刻な副作用（例えば、非ステロイド抗炎症剤による胃潰瘍、またはステロイド乱用によるさらに重症の毒性）を引き起こす。

【0002】

これらの疾患をより効果的に治療できる化合物（およびその有効な送達法）に対して大きなニーズがあることは明らかである。炎症性疾患の複雑で多面的な性質は、単一の分子作用機構を有する物質では、そのような治療目的を達成する候補となり得ないことを、意味する。

【0003】

関節炎

リウマチ様関節炎（RA）は、衰弱性の慢性炎症疾患であり、関節組織の疼痛、腫脹、滑膜細胞増殖（パンヌス形成）および破壊を特徴とする。進行した段階では、この疾患はしばしば、重要な臓器に傷害を与え、致命的となることがある。この疾患には、免疫系の多様な構成成分（マクロファージ／単球、好中球、B細

胞およびT細胞)、複雑なサイトカイン相互作用、および滑膜細胞異常と増殖が関与する。現在のところ、メソトレキセートのような疾患緩和性抗リウマチ薬(DMARDs)、およびシクロスポリンまたはアザチオプリンとの併用による、早期の攻撃的治療が推奨される(Arthritis and Rheumatism 39(5):713-722, 1996を参照)。

【0004】

結晶誘導性関節炎は、関節でのマクロファージと好中球の結晶誘導性活性化が特徴であり、激しい痛みが何日も続く。疾患が進行すると、症状の発症間隔が短くなり、患者がその病的状態を受け入れがたいレベルにまで上昇する。この疾患は一般に、非ステロイド抗炎症剤(NSAID)による対症療法が行われる(LeaとFeigigerによるArthritis and Allied Conditions、McCartyら、フィラデルフィア1495、1985を参照)。

【0005】

再狭窄

再狭窄は、血管壁肥厚と血管により供給される組織への血流の減少とに至る慢性型の血管傷害である。この炎症性疾患は、血管再生操作(血管閉塞を緩和する任意の操作を含む)に応答して起き、これがこれらの処置の有効性を制限する主要な限定要因となっている。現在、ヒトの再狭窄の防止のための認可された治療法は無い。全身性治療(例えば、アスピリン、カルシウムチャネルブロッカー、ヘパリン、ステロイドまたはコルヒチン)は、この疾患の治療においてあまり良い結果を示していない。

【0006】

炎症性腸疾患(IBD)

この疾患は、小腸に影響を与えるクローン病と潰瘍性大腸炎を意味する。IBDは、拡大と緩解の周期が特徴である。関節炎症は、IBDの拡大と同時に起きる。IBDの他の合併症には、皮膚、口、目の炎症があり、小腸の癌を引き起こすことがある。これらの疾患の慢性症状には、小腸閉塞、穿孔、膿瘍、および出血があり、疾患部位の外科的除去により治療することが多い。

【0007】

IBDの原因は不明である。潰瘍性大腸炎では、潰瘍形成に至る大腸粘膜の炎症反応がある。好中球浸潤も一般的であり、炎症の発症が繰り返されると、繊維症を引き起こし、最終的に癌を引き起こすことがある。クローン病は、小腸中のマクロファージと好中球に関連した慢性炎症が特徴である。疾患が進行すると、腸が肥厚し、管腔の狭窄が起き、次に潰瘍が発生する。IBDの真に有効な薬学的治療法は無い。症状は、コルチステロイドまたはアミノサリチル酸のような非ステロイド抗炎症剤により緩和する。

【0008】

慢性炎症性肺疾患

この炎症性疾患には、喘息、塵肺、閉塞性肺疾患、鼻ポリープ、および肺繊維症がある。典型的にはこのような疾患は、免疫細胞（例えば、好中球、マクロファージおよびリンパ球）の活性化、患部の侵襲性炎症プロセスおよび肥厚が特徴である。例えばポリープは、鼻の内側の組織の肥厚が特徴である。現在の薬物療法では一般に、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤を使用して炎症症状を治療している。

【0009】

慢性炎症性皮膚疾患（例えば、乾癬または湿疹）

乾癬は、一般的な慢性炎症性皮膚疾患であり、病変が盛り上がり、肥厚し、鱗状になり、これはかゆく、ひりひりし、突き刺す痛みがあり、また容易に出血することが特徴である。これらの疾患は、疾患の後期に細胞増殖と血管形成性成分を有するが、患者はしばしば関節炎症状を伴う。細胞増殖または血管形成のみを標的とする治療法は、この疾患の治療には有効ではないようである。この疾患の原因は未知であり、現在この疾患の治療法は無い。

【0010】

この疾患は、好中球蓄積と活性化、細胞増殖と血管形成が特徴であり、この炎症性疾患の複雑で多面的な性質を示している。皮膚細胞は、2つの増殖経路（正常の増殖または創傷治癒）に従う。正常増殖では、基層で細胞が形成され、表皮を通過して皮膚表面まで進む。死滅細胞は、その下の新しい細胞が形成するのと同じ速度で、表面からはがれる。創傷治癒中に、増殖と修復の加速が誘導されて

、皮膚細胞の急速なターンオーバー、血液供給の増加と炎症を引き起こす。ある面では、乾癬は、創傷治癒プロセスが過大したものである。皮膚が、作られるのと同じ速度で皮膚細胞（ケラチン細胞）をはがしていかない場合は、蓄積される。これは、鱗状の病変と血管形成（血液供給を増やすため）につながる。同時に、リンパ球、好中球およびマクロファージがこの領域に侵入し、痛み、腫脹および炎症を引き起こす。現在の薬物療法は一般に、ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤を使用して炎症症状を治療している。メソトレキセートやシクロスポリンもまた、使用されるが効果は小さい。

【0011】

外科的癒着

外科的癒着形成は、複雑な炎症性疾患であり、正常な場合には体内で分かれている組織が、通常外科的外傷の結果として互いの中に増殖していく。これらの癒着は、手術が失敗する大きな原因であり、腸の閉塞と不妊の最大の原因である。他の癒着関連の合併症には、慢性の骨盤疼痛、尿道閉塞、および排尿機能異常がある。炎症性プロセスには、傷害組織での好中球蓄積と活性化、隣接組織のフィブリン沈着と結合、マクロファージ浸潤、その領域への繊維芽細胞増殖、コラーゲン沈着、血管形成、および永久的癒着組織の樹立がある。現在の治療法には、フィブリン沈着の防止、炎症の低減（ステロイドおよび非ステロイド抗炎症剤）、およびフィブリン沈着物の除去がある。これらのすべての方法は、癒着形成の重症度を低下させるのに効果は無く、この疾患の細胞増殖または血管形成のみを特異的な標的とする治療法は、有効であることが期待できない。

【0012】

多発性硬化症 (MS)

この疾患は、神経系の最も一般的な炎症性疾患である。患者のほぼ半数は、認識機能の軽い障害と神経機能の喪失から、視覚活動の喪失、歩行のような運動機能の乱れ、失禁、および感覚欠陥による、より慢性の身体障害状態に進行する。MSに対して最近使用が認可された治療法には、インターフェロン-B (Patyら, Neurology 43:662-667) があり、これはクオリティオブライフを改善するが、疾患の進行には影響を与えない。Hunterら (W0/98/24427で公開されたPCT出願) は、

パクリタキセルのような抗微小管剤がMS進行を抑制すると提唱している。パクリタキセルは微小管を安定化するのみでなく、MAPキナーゼ (Jackson J.K.ら、Immunology 1997, (90) p502-510) やAP1 (Huiら、Arthritis and rheumatism, 41(5) p 869-876 1998) のような炎症性疾患に関与する中枢シグナル伝達因子を阻害するため、これらの疾患の治療におけるこの薬剤の正確な作用機序は不明である。

【0013】

MSは、神経系の脱髄と、その後の体の周りの神経メッセージの破壊が特徴である。疾患が進行すると、神経の周りの免疫細胞活性と神経上の星状細胞増殖に関連する、脳内の進行性の脱髄が起きる。神経の周りでは食作用性マクロファージが活性であり、酸素ラジカル産生の増加、プロテアーゼ分泌の増加、およびミエリン破壊の上昇がある。MS患者からのマクロファージ/単球は、「警戒」またはプライムされた半活性化状態にあり、ミエリンを破壊する可能性のある酸素ラジカルやプロテアーゼを過剰分泌し (Fisherら、Inflammation 12(2) 123-31 1998 またはPodikoglouら、Neurology 44(1) 129-132 1994を参照)、MS患者の好中球は、非MS患者の好中球より強固に腫瘍壊死因子- α (MSにおける一般的なプライミングサイトカイン) に結合し、MSの進行に好中球が関与する (Ziaber, J.ら、Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology 10(2):98-101 2000) ことを示すと報告されている。より詳細な研究は、MSの悪化の間および慢性の進行性MSの過程で、好中球は、より多くの炎症誘発性細胞マーカーを発現することを証明した (Zieberら、Mediators in Inflammation 7(5):335-8 1998)。好中球およびマクロファージの酸素ラジカルおよびプロテアーゼ機能を阻害することは、ミエリン傷害を抑制する1つの手法を与える。別の治療的アプローチは、神経の周りにこれらの細胞が蓄積することを防ぐ方法としての、好中球のプログラムされた細胞死 (アポトーシス) の促進である。

【0014】

W098/24427で公開されたPCT出願は、抗微小管剤の治療的用途を記載している。実際この公報には、そのような抗微小管活性はまた、例えば再狭窄の阻害と血管形成の阻害におけるカンプトテシン (camptothecin) によって示されることを

示すデータが含まれる。カンプトテシンはまた、トポイソメラーゼⅠインヒビターとして知られ、癌治療における抗ウイルス剤および放射性感作物質として有用である (Takimoto, C.H.ら(1998) Biochemica et Biophysica Acta, 1400:107-119; およびWang, D.S.ら、(1996) Biol. Pharm. Bull. 19:354-359)。カンプトテシンはまた、乾癬の細胞増殖状態に対しての使用の可能性が提唱されている (Lin, X.R.ら、(1998) Int. J. Dermatology 27(7):475-476を参照)。本発明以前には、炎症性疾患がトポイソメラーゼの阻害により治療されることは記載されていない。

【0015】

発明の概要

本発明は、炎症性疾患が再狭窄または乾癬であり、トポイソメラーゼインヒビターがカンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合に、炎症性疾患の治療用医薬品の製造におけるトポイソメラーゼインヒビターの使用を提供する。

【0016】

本発明はまた、トポイソメラーゼインヒビターを含む医療器具、例えばトポイソメラーゼインヒビターがカンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合の医療器具を提供する。

【0017】

本発明はまた、炎症性疾患が再狭窄または乾癬であり、トポイソメラーゼインヒビターがカンプトテシンまたはその類似体もしくは誘導体ではない場合の、治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビターを患者に投与するか、または治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビターを含む医療器具を患者に移植することを含む、患者の炎症性疾患の治療法を提供する。

【0018】

本発明は、トポイソメラーゼと称する核酵素を阻害する化合物群を使用する、炎症性疾患を治療または予防するための方法を提供する。これらの化合物 (トポイソメラーゼインヒビター) は、薬剤学的に許容される担体を使用して、経口、鼻内、直腸内、静脈内、腹腔内、筋肉内、または直接疾患部位に、投与される。

本発明の1つの実施形態において、疾患部位に局在化してもよい化合物のポリマー調製物は、治療上有効な量の化合物の制御放出を可能にする。(a)ポリマー担体と(b)トポイソメラーゼインヒビターとを含む組成物が提供される。これらの組成物は、上記化合物の全身性送達に関連する毒性を低下させるために、疾患部位にのみ有効量の化合物を放出することを可能にする。さらに疾患に関連する炎症性プロセスは、低濃度の上記化合物に長時間暴露することにより阻害することができる。本明細書に記載の方法は、低濃度のトポイソメラーゼインヒビターの長期放出を可能にし、こうして全身性または局所的毒性を最小限にして有効な阻害活性をもたらす。

【0019】

抗炎症因子として本発明の範囲内で使用されるトポイソメラーゼインヒビターには、例えばトポイソメラーゼ1インヒビター（例えばカンプトテシンおよびその類似体および誘導体）がある。また本発明には、他のトポイソメラーゼ1または2インヒビター、例えばエトポシド、ドキシソルビシン、 β ラパコン（beta-lapachone）、ナフトキノン、および後者の化合物の類似体もしくは誘導体、ならびに本明細書に記載の他のインヒビターが含まれる。

【0020】

トポイソメラーゼインヒビターは癌細胞増殖をブロックする（これは、通常そのような治療法の単一のおよび中心的標的である）ことから、トポイソメラーゼインヒビターの阻害作用は、もっぱら癌の治療のために、すでに医薬品業界で利用されている。炎症性疾患は、細胞増殖が関与する状態を示すことが多いが、これらの疾患は、多くのプロセスを含む。すなわち、炎症性疾患の有効な治療法は、細胞増殖のみの阻害に基づくことはできない。

【0021】

細胞増殖の治療に類似した癌治療法の別の態様は、腫瘍に供給する血管の形成（血管形成）を防止することによる、腫瘍増殖の抑制である。最近、血管形成を阻害することにより腫瘍増殖を防ぐことができる物質として、アンギオスタチン（angiostatin）のような新しい抗血管形成薬剤が開示されている。腫瘍増殖は血管形成に依存するが、非癌性炎症性疾患はそうではない。例えば乾癬、関節炎

および外科的癒着のような炎症性疾患では、血管形成は、疾患の後期のより慢性の時期に起きる。すなわち、血管形成のみを特異的に標的とすることは、炎症性疾患の有効な治療法とはならないであろう。

【0022】

本発明により、トポイソメラーゼインヒビターは、例えば血管形成に關与する内皮細胞増殖、または再狭窄に關与する平滑筋細胞増殖、またはリウマチ様関節炎に關与する滑膜細胞増殖を阻害するが、トポイソメラーゼインヒビターはまた、炎症性疾患に關与する他のプロセスを阻害して、そのような疾患の有効な治療法を提供することが証明される。しかし一部のトポイソメラーゼインヒビターの中には、その阻害プロフィールに關連する許容できない毒性を誘導するものもあり、従って、ある特定の疾患に対してこれらの薬剤の使用が限定されるか、またはその使用が、本明細書に開示されるように、注意深く制御された放出または服用量のある状況に限定されるべきである。

【0023】

カンプトテシン、エピーポドフィロトキシシン (epi-podophylotoxins) (例えば、エトポシド)、アントラサイクリン (例えばドキソルビシン)、および1,2ナフトキノン (例えば、 β -ラパコン (beta-lapachone)) のようなトポイソメラーゼインヒビターは、合併症を伴わず炎症性疾患の多様な状態を阻害する。まとめて1,4ナフトキノンとして知られているトポイソメラーゼインヒビター (例えば、プルムバギン (plumbagin)、メナジオン (menadione)、ジュグロン (juglone) およびローソン (lawsone)) は、多くの個々の炎症性プロセスを阻害するが、許容できない毒性を誘導することもある。しかし、これらの化合物は、強力で即時的な抗好中球活性を示すため、これらは、本明細書に開示のないいくつかの炎症性疾患の治療に適している。

【0024】

トポイソメラーゼインヒビターのポリマー性送達のために、広範なポリマー担体を使用することができ、その代表的なものには、ポリマー (エチレン酢酸ビニル)、ポリマー (乳酸)、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン、ポリエチレングリコール、プルロニックス、ポリマー (バレロラクトン)、ポリマー (無水物)、多

糖、およびこれらのコポリマー、誘導体、および混合物がある。

【0025】

これらのインヒビターを送達するのに他の投与法も使用できるが、好適な方法は、疾患部位に局在化されることを目的とし、治療上有効な量の化合物の制御放出（徐放）を可能にする阻害性化合物のポリマー調製物の使用を含む。

【0026】

ある実施形態では、そのような組成物は、細胞核中でトポイソメラーゼⅠ活性を阻害する化合物（例えば、カンプトテシンまたはその類似体および誘導体）を含む。他の実施形態において組成物は、トポイソメラーゼⅡを阻害する化合物（エトポシド、ドキソルビシン、 β ラパコン、ナフトキノン（例えば、プルムバギン、メナジオン、ジュグロンおよびローソン）、ならびに前者の類似体および誘導体）を含む。

【0027】

本発明のある実施形態において、組成物は平均粒径 $0.01\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ を有する。ある実施形態において組成物のポリマー担体は、100ダルトン \sim 500,000ダルトン以上の範囲の分子量を有する。さらに別の実施形態において、組成物は、厚さ $10\mu\text{m}\sim 2\text{mm}$ のフィルム、またはある温度（例えば、 50°C より高い温度）では液体であり、別の温度（例えば、 37°C ）では固体である熱活性組成物、または室温では液体であるが別の温度（例えば 37°C ）の水性媒体中では半固体である組成物に、形成される。

【0028】

本発明のさらに別の実施態様において、患者への移植を目的とする器具が提供される。例えば、全体に管状構造のステントが提供され、ここでステントの表面は、1種以上の抗炎症組成物で被覆されている。すなわち本発明の他の態様において、体の通路のタリーン（tureen）を拡張するための方法が提供され、該方法には、ステントを通路に挿入し（ここで、ステントは全体に管状構造で、構造体の表面は上記したように抗炎症組成物で被覆されている）て、通路を拡張することが含まれる。さらなる例は、胆管ステントのような医療器具を胆管通路に挿入することを含んでなる、胆管閉塞を取り除くための方法；ステントのような尿道

器具を尿道に挿入することを含んでなる、尿道閉塞を取り除くための方法；ステントのような食道器具を食道に挿入することを含んでなる、食道閉塞を取り除くための方法；ならびに、ステントのような気管／気管支器具を気管または気管支に挿入することを含んでなる、気管－気管支閉塞を取り除くための方法を含む。これらの実施形態のそれぞれで、器具の表面は、上記の抗炎症組成物を含む（例えば、器具上に被覆される）。

【0029】

本発明の別の態様において、患者の再狭窄を阻止する方法であって、患者の血管に、治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビター（例えば、エトポシド、 β ラパコン、またはドキソルビシン、しかし、1,4ナフトキノンのうちプルムバギン、ローソン、ジュグロン、およびカンプトテシンではない）を、投与することを含んでなる方法が提供される。この方法での使用に適した組成物はまた、再狭窄部位または再狭窄の可能性のある部位に外科的に移植されるか、またはカテーテルを介してポリマーペーストもしくはゲルとして注入されるポリマー担体を含む。

【0030】

本発明の別の態様において、リウマチ様関節炎を治療する方法であって、患者に治療上有効な量のトポイソメラーゼインヒビター（例えば、カンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、および β ラパコン、しかし次の1,4ナフトキノンの1種であるメナジオンは使用可能である。この方法での使用に適した組成物には、抗関節炎化合物の制御放出担体として、関節中に注入可能なポリマー担体がある。そのようなポリマー担体は、封入した薬剤を含有するポリマー性微粒子またはペーストの形を取っても良い。

【0031】

本発明のさらに別の態様において、トポイソメラーゼインヒビターを含有する組成物を、圧排法を行わずに、患者に投与することを含んでなる、好中球が関与する炎症性症状を治療する方法が提供される。そのような症状の例には、結晶誘

導性関節炎；骨関節炎；非リウマチ様炎症性関節炎；混合型結合組織病；シェーグレン症候群；強直性脊椎炎；ベーチェット症候群；サルコイドーシス；乾癬；湿疹；炎症性腸疾患；慢性炎症性肺疾患；神経疾患；および多発性硬化症がある。これらの薬剤は、好中球活性化のある炎症部位に対し、ポリマー担体中に配合されて適用される。

【0032】

本発明のさらに別の態様において、トポイソメラーゼインヒビターを含有する組成物を、圧排法を行わずに、患者に投与することを含んでなる、外科的癒着の治療法が提供される。トポイソメラーゼインヒビター（例えば、カンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、またはβラパコン）は、手術部位に投与可能なポリマー担体に配合される。

【0033】

本発明のさらに別の態様において、(a)容器中にトポイソメラーゼを阻害するいくつかの化合物、および(b)医薬品の製造、使用、または販売を規制する管理機関により規定された形の、容器に付随する通知、とを含む薬品が提供され、ここで、通知は、例えば炎症性関節炎、再狭窄、外科的癒着、乾癬、移植片拒絶、炎症性腸疾患および炎症性肺疾患のような炎症性疾患を治療するためのヒトまたは動物への投与用のトポイソメラーゼ活性を阻害する化合物の、管理機関による認可を反映するものである。化合物または組成物の使用についての説明書も含まれる。そのような説明書は、患者への投与量と投与方法に関する情報を含みうる。

【0034】

さらに別の態様においてトポイソメラーゼインヒビターは、例えばステント、縫合糸、留置カテーテル、人工器官などの、手術もしくは医療器具またはインプラント内に含有されるように調製されるか、またはここから放出されるように作製される。

【0035】

本発明の種々の実施形態においてトポイソメラーゼインヒビターは、他の化合物または組成物（例えば、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、噴霧剤

、発泡剤、ムース、コーティング、ラップ、ペースト、バリア、インプラント、微小球、微粒子、フィルムなど）とともに製剤化される。ある実施形態において、化合物または組成物は、担体として機能し、これはポリマーまたは非ポリマーとしうる。ポリマー担体の代表例には、ポリ（エチレン酢酸ビニル）、ポリウレタン、ポリアンヒドリド、ポリオルトエステル、乳酸とグリコール酸のコポリマー、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸）とポリ（カプロラクトン）のコポリマー、ゼラチン、多糖（例えば、キトサンおよびヒアルロン酸）、コラーゲンマトリックス、セルロースおよびアルブミン、ならびにこれらのポリマーの誘導体、コンジュゲートおよびコポリマーがある。他の適当な担体の代表例には、特に限定されないが、エタノール；エタノールとグリコールの混合物（例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコール）；エタノールとイソプロピルミリステート、またはエタノール、イソプロピルミリステート、および水の混合物（例えば、55：5：40）；エタノールとエイネオールまたはD-リモネンの混合物（水を含むかまたは含まない）；グリコール（例えば、エチレングリコールまたはプロピレングリコール）、ならびにグリコール（例えば、プロピレングリコールと、水、ホスファチジルグリセロール、ジオレオイルホスファチジルグリセロール、トランスクトール（Transcutol）（登録商標）、またはテルピノレンとの混合物；イソプロピルミリステートと、1-ヘキシル-2-ピロリジン、N-ドデシル-2-ピペリジノンまたは1-ヘキシル-2-ピロリドンとの混合物がある。

【0036】

本発明のこれらのおよび他の態様は、以下の詳細な説明と添付図面を参照することにより明らかであろう。

【0037】

詳細な説明

本明細書において用語「トポイソメラーゼインヒビター」は、トポイソメラーゼを阻害するように作用する任意の化合物または組成物を含むものと理解されたい。多くの例が本明細書において開示される。さらに用語「類似体」または「誘導体」は、トポイソメラーゼインヒビターに関して使用され、これらの用語は、

誘導体または類似体である、トポイソメラーゼインヒビターの既知の構造に由来するトポイソメラーゼインヒビターの活性を有する任意の化合物を意味する。本明細書に記載の種々のタイプのトポイソメラーゼインヒビターについて、その種々の類似体および誘導体が当該分野で公知であり、その多くは、本明細書で具体的に開示される。

【0038】

本明細書において用語「炎症性疾患／障害」は、本明細書に記載のような疾患の特徴を有する、任意の非癌性の炎症性疾患を含むものと理解されたい。多くの例が提供される。

【0039】

本明細書において用語「治療」は、炎症性疾患に関連する症状の緩和（特に限定されないが、そのような疾患の治癒を含む）を含むものと理解されたい。この用語はまた、疾患の阻止（特に限定されないが、そのような疾患の予防を含む）を含むものと理解されたい。

【0040】

本明細書において用語「医薬品」は、医薬組成物、ならびに疾患を治療するために適用される任意の医療器具、インプラントなどを含むものと理解されたい。従って本明細書の抗炎症性医薬品は、例えばトポイソメラーゼインヒビターを組み入れるかまたは含有させることにより、炎症性疾患の治療のために作製した医薬組成物、ならびにそのような疾患の治療に適合化させた医療器具、インプラントなどを含む。

【0041】

本明細書において用語「抗炎症剤／因子」は、トポイソメラーゼインヒビターを含む、炎症事象を抑制するように作用する任意のタンパク質、ペプチド、化学物質または他の分子を含むものと理解されたい。

【0042】

本明細書において用語「ポリマー薬剤送達」は、炎症性因子がポリマー中で活性型で維持され、長時間にわたりこのポリマーから制御放出されるように、ポリマーまたはポリマーの混合物中への抗炎症因子の組み込みを含む。そのようなポ

リマー調製物は、当該分野で公知であり、生分解性、非生分解性、または水溶性ポリマーから製造され、種々の形状（例えば、桿状の器具、ペレット、スラブ、カプセル、フィルム、ペースト、ゲル、微小球、スプレー、泡状物または移植される医療器具上のコーティング）で作製される。

【0043】

本発明は、炎症性疾患を治療または予防する方法を提供する。本方法は、医学的に許容される手段で投与される薬剤学的に許容される担体の使用を含む。このような方法には、経口、鼻内、直腸内または注射投与がある。しかし好適な方法は、疾患部位に局在化され、治療上有効な量の化合物の制御放出を可能にする、1種以上のトポイソメラーゼインヒビターのポリマー調製物を使用する。(a) 1種以上のトポイソメラーゼインヒビターと(b)ポリマー担体とを含む組成物が提供される。本発明で使用されるトポイソメラーゼインヒビターには、トポイソメラーゼIインヒビターとトポイソメラーゼIIインヒビターがあつ。トポイソメラーゼIインヒビターには、カンプトテシン、インドイノキノリンジオン (NS6314662) ; ベンゾアントラセン、例えばサントピンサナ (santopinsana) (UC36) ; ベンゾフェナチジン、例えばニチジン (nitidine) 、ファガロニン (fagaronine) およびコラルイン (coralyne) 、イントプリシン (intoplicine) ; インドロカルバゾール、例えばNB506、KT6006、およびレベッカマイシン; アントラサイクリン、例えばノルホリノドキシソルビシン、アクラシノマイシンおよびルドフォマイシン; ペプチド、例えばアクチノマイシン、およびNUICRF505; ベンズイミダゾール、例えばヘキスト33342と2,5-置換ベンズイミダゾールおよびブルガレム (bulgarem) がある。トポイソメラーゼIIインヒビターには、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、エトポシドおよびテノポシドがある。他に多くのトポイソメラーゼインヒビターも同定されており、例えば1,2ナフトキノン（例えば β -ラパコン）および1,4ナフトキノン、例えばブルムバギン、ジュグロンおよびメナジオンがある (Baguley BCら、Biochemica et Biophysica Acta 1400:213-222, 1998; Burden Dら、Biochemica et Biophysica Acta, 1400:139-154, 1998; Felix CA、Biochemica et Biophysica Acta, 1400:237-255, 1998)。トポイソメラーゼインヒビターの他の例は、チェブラグレ酸

(chebulagre acid)、アクラシノマイシン、ジスタマイシン、およびレキシトプシン (Pommier Y, Biochemica et Biophysica Acta, 1400:83-106, 1998)、アムサクリン、アウリントリカルボン酸、エリプチシン、ノガラマイシン、ストレプトニグリン、スラミン、TAS130、トポスタチン、ナリジキシン酸、ソブゾン、IST622、およびBE-10988である。

【0044】

トポイソメラーゼインヒビターは、トポイソメラーゼを阻害するという共通の特徴を有する。トポイソメラーゼが阻害されるかどうかを測定する方法は、当該分野で公知である。トポイソメラーゼは、スーパーコイルDNAを切断し、DNAの複製、転写、および組換えを可能にする。トポイソメラーゼにはIとIIの2つの大きな分類がある。I型トポイソメラーゼは、1本鎖切断を触媒し、II型トポイソメラーゼは、DNA中の2本鎖の切断を誘導する。染色体分離とDNA複製は、腫瘍細胞増殖の必須のプロセスであるため、トポイソメラーゼインヒビターは、癌の治療に使用される。

【0045】

トポイソメラーゼインヒビターに関連する毒性問題を、本明細書で詳細に考察する。しかし、他の毒性を有する可能性のある抗癌剤が炎症性疾患の治療に使用されているため、炎症性疾患の治療のために毒性化合物の用量を制御する手段は当該分野で公知である。1つの例はメトトレキサートであり、これは、慢性関節リウマチの積極的治療の選択薬剤となっている。

【0046】

本発明の好適な投与経路は、炎症性疾患の局所的治療のための制御放出を可能にする、トポイソメラーゼインヒビターのポリマー性制御放出剤形を使用する。疾患部位における局在化された除放性デポ剤の使用は、疾患部位で有効な治療濃度の薬剤が維持されることを可能にし、一方繰り返し静脈内投与および高血漿薬剤濃度を避けることができる。

【0047】

カンプトテシン

カンプトテシンは、強力なトポイソメラーゼIインヒビターであり、植物抽出

物を抗癌活性についてスクリーニングすることにより発見された (Wall MEら、J. Ethnopharmacology, 51:239-254, 1996)。この化合物は、動物で広範囲の抗腫瘍活性を示す。この薬剤は、塩（例えばナトリウム塩）として調製されるが、塩形成により化合物の抗癌活性の多くが失われ、その毒性プロファイルが悪化する。可溶性および毒性プロファイルが改善された誘導体型のカンプトテシン (CPT-11 (イロノテカン (ironotecan)) とトポテカン (topotecan)) などが知られており、これらは、それぞれ大腸癌と卵巣癌の治療での使用が認可されている。カンプトテシンとその類似体（例えばCPT-11とトポテカン）のコア構造は、平面状の5員環 (A~E) 構造である。誘導体化は、A環とB環について行われるが、すべての既知の形態のカンプトテシンに共通の構造的特徴は、E環のアルファ-ヒドロキシラクトン系であり、これは高pHで開環し、酸性pHで閉環する。本発明で使用するカンプトテシン誘導体の例には、特に限定されないが、トポテカン、イロノテカン、sn-38、GI147211 (GG211)、9-ニトロカンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、dx-8951(f)ポリピロールカルボキサミドコンジュゲート、メチレンジオキシカンプトテシンおよびカンプトテシンの4級アンモニウム塩、6員環誘導体、および脂肪酸エステル、ならびにこれらのすべての物質のさらなる誘導体と類似体がある。(Takimoto CH.ら、カンプトテシンの臨床応用の総説、Biochemica et Biophysica Acta 1400 p 107-119, 1998、またはPommier Yら、「DNAトポイソメラーゼIとインヒビターの多様性」、Biochemica et Biophysica Acta, 1400:83-106, 1998を参照)。有効なトポイソメラーゼ活性は、ラクトン型のカンプトテシンからのみ利用可能であり、生理学的pHでは非ラクトン型が支配的であるため、不活性化薬剤への急速な血漿変換、これらの薬剤の急速なクリアランス、およびこれらの薬剤の治療濃度を維持することに関連する毒性問題のために、現在の治療法は制限される。繰り返し投与またはゆっくりした注入が、癌治療におけるこれらの薬剤の有効性を改善する方法であると考えられている (Gerrits CJH, Br J Cancer, 76:952-962, 1997; Pommier Y, Biochimie, 80:255-270, 1993; Pommier Yら、Biochemica et Biophysica Acta 1400:83-106, 1998)。本発明は、炎症性疾患の局在化治療のために、ポリマー送達において活性型（例えば、ラクトン型）のカンプトテシンを使用する方法を記載する。これは、

活性型の薬剤の徐放を可能にし、その結果、繰り返しまたは連続的全身投与の必要性や関連する毒性無しで、標的組織の長期暴露が達成される。

【0048】

他のトポイソメラーゼIインヒビター

トポイソメラーゼIを阻害する他の化合物は、インドイノキノリンジオン；NS6314662；ベンゾアントラセン、例えばサイントピンサナ (saintopinana) UC36；ベンゾフェナチジン、例えばニチジン、フェガロニンおよびコラリン、イントプリシン；インドロカルバゾール、例えばNB506、KT6006、およびレベッカマイシン；アントラサイクリン、例えばノルホリノドキソルビシン、アクラシノマイシンおよびルドフォマイシン；ペプチド、例えばアクチノマイシン、およびNUIC RF505；ベンズイミダゾール、例えばヘキスト33342と2,5-置換ベンズイミダゾールおよびブルガレム；ラパコン；チェブラグレ酸；アクラシノマイシン；ジスタマイシン；レキシトプシン (Pommier Y, Biochemica et Biophysica Acta, 1400:83-106, 1998)；およびノガラマイシンである。これらの物質の多くはまた、公知の抗生物質である。

【0049】

トポイソメラーゼIIインヒビター

トポイソメラーゼIIインヒビターは、しばしばインターカレーター（例えば、アクリジン、アクチノマイシン、アントラセンジオン、アントラサイクリン、ベンゾイソキノリジオン、エリプチシンおよびピリドカルバゾール）または非インターカレーター（例えば、エピポドフィロトキシンおよびフォストリエシナン類似体）として分類される (Damayanthi Yら、Current Medicinal chemistry, 1998, 5 p 202-252を参照)。トポイソメラーゼIIインヒビターは、2本鎖切断複合体を安定化させる。すなわち、複製フォークが介入することなく、DNAに広範な傷害が与えられる。このような傷害は、早期のプログラムされた細胞死（アポトーシス）を引き起こす。トポイソメラーゼIIは、染色体の安定な維持に密接に関連し、この酵素の阻害は、欠失または非相同的組換えを引き起こし、従ってトポイソメラーゼIIインヒビターの突然変異誘導性を樹立させる。

【0050】

トポイソメラーゼⅠインヒビターは、DNAの1本鎖切断のみを誘導する。後者の切断複合体は、カンプトテシンにより安定化され、DNA鎖は、進行するDNA複製フォークが、安定化された切断複合体と衝突する時にのみ、切断される。従って細胞中のトポイソメラーゼⅡを標的とする化合物は一般に、トポイソメラーゼⅠを標的とするものより毒性が強い。これらのインヒビターの危険な毒性プロフィールにもかかわらず、トポイソメラーゼⅡを標的とする少なくとも6つの化合物が、癌治療での使用のために米国で認可されている。これらは、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、エトポシドおよびテノポシドである。

【0051】

エトポシドとテノポシドは、小細胞肺癌、白血病およびリンパ腫の治療のために、一般的に処方される抗癌剤である。これらの薬剤はいずれも、R₁位の小さい置換基以外は、同一の構造を有する誘導体化されたポドフィロトキシン（エピポドフィロトキシンと呼ぶ）である。エトポシドは、この2つの薬剤のうちで最も頻繁に処方される薬剤であり、毒性問題については実質的に同じであるため、以後の考察はエトポシドにのみ限定する。エトポシドは、多くの癌治療のための抗癌剤カクテルの一部として使用され、この薬剤の長期低用量投与が好ましい。この薬剤は、経口投与してもよいが、3～5日間の静脈内注入が好ましい。エトポシドは、水にあまり溶けず、ポリソルベート80／ポリエチレングリコールおよびアルコールとともに調製し大量の水で希釈する必要があるため、投与が問題となる。エトポシドホスフェート（やや水溶性）を、このような調製問題を克服するために使用してもよい。エピポドフィロトキシンに関連する毒性には、骨髄抑制（用量限定毒性）、吐き気、嘔吐、および脱毛がある。高用量処方では、他の多くの毒性が観察されている。これらの薬剤を投与されている患者では、高率（2～12%）の潜在性白血病が報告されている。テノポシドは、*in vitro*でより有効な細胞傷害性物質であるが、この薬剤は、エトポシドより疎水性（不溶性）であるため、調製問題が複雑になる（Hande KR、*Biochemica et Biophysica Acta*, 140 0:173-184, 1998；Doll, D.C.ら、*Leukemia Research*, 22:7-12, 1998）。

【0052】

本発明において、制御放出性のポリマー剤形のエピポドフィロトキシンは、全身性毒性の低い抗炎症治療法を可能にするために、炎症性疾患部位に適用される。

【0053】

別のグループのトポイソメラーゼIIインヒビターは、アントラサイクリンである。これらの化合物は主に、「細胞増殖抑制性活性抗生物質」と呼ばれるが、一般にこれらは、毒性のために抗生物質として使用されない。(Mutschlerら、薬物作用：基礎的原理と治療的側面、1995、CRC press Boca Raton p605を参照)。米国では、この群の3つの化合物が、ある範囲の癌の治療にしばしば薬剤の「カクテル」の一部として、抗癌剤として使用されている：ドキソルビシン、ダウノルビシン（およびプロドラッグゾルビシン）ならびにイダルビシン／エピルビシン。これらの薬剤は、深刻な毒性問題（例えば、骨髄抑制、粘膜炎、吐き気、および嘔吐）を有し、また重症の心臓傷害を誘導することがあり、これは蓄積性で、通常最初の治療後何ヶ月も経たないと現れない。心臓毒性は、これらの薬剤のピーク血中濃度に関連し、上記薬剤（FDA認可）のゆっくりした注入により低下（わずかに）させることができる（Burden DAら、Biochemica et Biophysica Acta, 1400:173-184, 1998）。循環する「遊離の」薬剤レベルを制御するドキソルビシンのリポソーム製剤が、報告されている。本発明では、炎症性疾患を治療するのにアントラサイクリンが使用され、好適な投与経路は、ポリマー剤形のアントラサイクリンを使用するものであり、これは、炎症性疾患部位に置かれ、低い全身性毒性で、治療上有効用量の薬剤の連続的放出を与える。

【0054】

ミトキサントロンは、1987年以来米国で癌治療に使用されているアントラキノンまたはアントラサイクリン類似体トポイソメラーゼIIインヒビターである。この薬剤はしばしば、ドキソルビシンの代替物として使用される。

【0055】

トポイソメラーゼの他の多くのインヒビターも同定されており、 β ラパコンや他のナフトキノンがある（Baguley BCら、Biochemica et Biophysica Acta 1400:213-222, 1998；Burden Dら、Biochemica et Biophysica Acta, 1400:139-154,

1998; Felix CA, Biochemica et Biophysica Acta, 1400:237-255, 1998)。βラパコンは、既知のトポイソメラーゼIとII阻害活性を有し、DNA傷害を誘導し、多くの癌細胞株でアポトーシスを誘導することが知られている。アルファおよびβラパコンの両方とも、熱帯の低木中で見つけられた、関節炎から癌までの広範な薬草治療で使用されている1,4-ナフトキノンラパコールから、合成することができる。βラパコンは、細胞傷害性および遺伝子障害性である。これらの作用は、10 μM未満ではほとんど活性は観察されず、この濃度より上では大量の細胞が死滅するというものである。S期の細胞に及ぼす報告されている抗増殖作用は、βラパコンが、増殖細胞中で選択的に細胞傷害作用を示し、その結果正常細胞への毒性が低下することを示す。in vivoでのβラパコンの作用は、疾患組織を化合物に長時間暴露することにより改善される (Vanni Aら、Mutation Research, 401:55-63, 1998; Wuerzberger SM, Cancer Research, 58:1876-1885, 1998; Chau YP, Free Radical Biology and Medicine, 24:660-670, 1998)。

【0056】

βラパコンの好適な適用方法は、この薬剤を種々の炎症性疾患で使用するための有効な処方アプローチを提供するポリマー剤形である。目的は、長期間にわたって連続的な有効用量 (10 μMより多い) を疾患部位に、低い循環薬剤濃度で提供し、こうして全身性毒性を最小にすることである。βラパコンと同様の活性を有する多くのβラパコン誘導体が同定されている (例えば、Sabbaら「βラパコン、腫瘍モデルにおける誘導体の合成と活性」J. Med Chem. 27, p990-994, 1984中の化合物)。プルムバギンやメナジオンのような1,4ナフトキノンは、DNAとインターカレートし、in vitroでトポイソメラーゼII介在性DNA切断を誘導することが知られている。本発明は、炎症性疾患を治療するためにトポイソメラーゼインヒビターであるナフトキノンの使用を提供する。

【0057】

トポイソメラーゼIIを阻害することが報告されている他の化合物は、アラルビシン、アクリラルビシン、スラミン、キノベノキサジン (例えば、A74932)、クロロキン、ノボビオシン、RP60475F、SN22995、ビスジオキソピペラジンICRF159と193およびその誘導体と類似体、アズレン (または偽アズレン) およびその誘導

体と類似体、アントラキノン（ダマナカンタールおよびモリンドン）およびその誘導体と類似体、キサントンとベンゾフェノンおよびその誘導体と類似体、NB506、イントプリシン、アムサクリンとして知られているアクリジンおよびその誘導体と類似体（例えば、AMCAとmAMCA）、フェラン型トリテレンノイドおよびその誘導体（例えば、フォストリエシン）である。

【0058】

本発明で使用可能なトポイソメラーゼIIを阻害することが知られている他の化合物は、ブファリン（およびブファノリド、ブファジエノリド、ブファトリエノリド、ブファリン、ブファタリン、ブフォトキシシンおよびブフォフィリンとして、全体としてまたは個々に知られている類似化合物）である（Watabe, M.ら、(1997) Cell Growth and Differentiation 8(8):871-879を参照）。ブファリン型の化合物は、細胞増殖ならびに血管形成に対して活性を有することがすでに報告されている（Lee, D.Y.ら、(1996) Life Sciences 60(2):127-134を参照）。

【0059】

多くのトポイソメラーゼインヒビターは、放射線増感物質であることが知られている。すなわち、過増殖細胞を含む炎症性疾患状態（例えば、再狭窄、外科的癒着、慢性関節リウマチ）は、放射線と本発明のトポイソメラーゼインヒビターの同時投与を含む併用療法により治療することができる。

【0060】

トポイソメラーゼインヒビターは、特定の炎症性疾患の治療にすでに使用されている他の薬剤と組合せて使用することができる。例えば本発明のある実施形態において、メトトレキサートが、関節炎の治療のためのトポイソメラーゼインヒビターとともに組合せて使用され、これはメトトレキサートがトポイソメラーゼ阻害活性を上昇させることが証明されているためである（Holden, S.A. (1995) Cancer Chemotherapy and Pharmacology 36(2):165-71）。

【0061】

ポリマー調製物

トポイソメラーゼインヒビターは、従来の投与経路により本発明に従って投与することができる。しかし、好適な方法は、ポリマー担体を使用する。上記の広

範な抗炎症因子に加えて、広範なポリマー担体（例えば、生分解性、非生分解性および水溶性組成物を含む）を使用して、本発明の抗炎症組成物が提供される。生分解性組成物の代表例には、アルブミン、ゼラチン、デンプン、セルロース、デキストラン、多糖、フィブリノーゲン、ポリエステル（例えば、ポリ（D,L-ラクチド）、ポリ（D,L-ラクチド-コ-グリコリド）、ポリ（ε-カプロラクトン）、ポリ（L-ラクチド）、および上記ポリマーのコポリマー、ポリ（グリコリド）、ポリ（ヒドロキシブチレート）、ポリ（アルキルカルボネート）、およびポリ（オルトエステル）がある（総説として、Illum, L., Davids, S.S.（編）「制御薬物送達におけるポリマー」、Wright, Bristol., 1987; Arshady, J. *Controlled Release* 17:1-22, 1991; Pitt, *Int. J. Phar.* 59:173-196, 1990; Hollandら、*J. Controlled Release* 4:155-0180, 1986）。非分解性ポリの代表例には、EVAコポリマー、エステル、炭酸エーテル、尿素ベースのポリウレタン、ポリウレタン、シリコーンゴム、ポリテトラフルオロエチレン、ポリカルボネート、ナイロンポリマー、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンおよびポリ（メチルメタクリレート）がある。水溶性ポリマーの代表例には、ポリエチレングリコール、ポロックス、ポリアクリル酸、ポリビニルピロリドン、多くの多糖およびポリビニルアルコールがある。特に好適なポリマー担体には、ポリエチレングリコール、ポリオキサマー、多糖、エチレンとプロピレングリコールとのブロックコポリマー、例えばポリ（エチレン-酢酸ビニル）（40%架橋）、ポリ（D,L-乳酸）オリゴマーおよびポリマー、ポリ（L-乳酸）オリゴマーおよびポリマー、ポリ（グリコール酸）、乳酸とグリコール酸とのコポリマー、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（バレロラクトン）、ポリアンヒドリド、ポリ（カプロラクトン）またはポリ（乳酸）とポリエチレングリコールとのコポリマーがあり、これらのすべての類似体、誘導體、コンジュゲートおよび混合物を含む。

【0062】

ポリマー担体は、種々の型で調製され、例えば微小球、桿状の器具、ペレット、スラブ、カプセル、フィルム、ペースト、ゲル、スプレー、泡状物、およびコーティングまたは移植可能な医療器具を含む（例えば、Goodellら、*Am J. Hosp. Pharm.* 43:1454-1461, 1986; Langerら、「ポリマーからの巨大分子の制御放出

」、Biomedical polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use, Goldberg, E.P., Nakagim, A. (編) アカデミックプレス (Academic Press)、pp. 113-137, 1980; Rhineら、J. Pharm. Sci. 69:265-270, 1980; Brownら、J. Pharm. Sci. 72:1181-1185, 1983; およびBawaら、J. Controlled Release 1:259-267, 1985を参照)。抗炎症因子は、ポリマー中に溶解され、粒子として懸濁され、ポリマーのマトリックス中に閉鎖されることにより連結され、共有結合により結合されるか、またはミクロカプセル中に封入される。本発明のいくつかの好適な実施形態において、抗炎症組成物は、微小球（ナノメートルからマイクロメートルの範囲の大きさ）、ペースト、種々のサイズの糸、フィルムおよびスプレーのような非カプセル製剤中で提供される。

【0063】

好ましくは本発明の抗炎症組成物（これは、1以上の抗炎症因子およびポリマー担体を含む）は、使用目的に適した方法で調製される。本発明のある実施態様においては、抗炎症組成物は生体適合性であり、数時間～数ヶ月の期間にわたって1以上の抗炎症因子を放出する必要がある。例えば、10%、20%、または25% (w/v)以上の抗炎症因子を7～10日間にわたって放出する「急速放出性」または「突発性」抗炎症組成物が提供される。このような「急速放出」組成物は、ある実施形態において、化学療法レベル（該当する時）の所望の抗炎症因子を放出することができる。他の実施形態において、1% (w/v)未満の抗炎症因子を7～10日間にわたって放出する「徐放性」抗炎症組成物が提供される。さらに、本発明の抗炎症組成物は好ましくは、数ヶ月間安定であり、無菌状態で製造し維持することができる。

【0064】

抗炎症組成物は、特定の使用に応じて、50nm～500 μ mの粒子サイズで調製してもよい。例えばある目的のために使用される時、抗炎症組成物を、15～500 μ m、好ましくは15～200 μ m、および最も好ましくは25～150 μ mの微小球で、調製することが好ましい。あるいは、そのような組成物はまた、「スプレー剤」として容易に適用することができ、これは、固化してフィルムまたはコーティングになる。そのようなスプレー剤は、広範なサイズ（例えば0.1 μ m～3 μ m、10 μ m～30 μ m

、および30 μ m~100 μ m)の微小球から調製される。

【0065】

抗炎症組成物はまた、他の種々の適用のために調製することができる。例えば角膜への投与のために、本発明の抗炎症因子は、ムコ接着性ポリマー（例えば、CARBOPOL（登録商標）のようなポリアクリル酸、デキストラン、ヒアルロン酸、ポリメタクリレート、またはデンプン（LeYungとRobinson, J of Controlled Release 1:5:223, 1988を参照）、またはナノメートルの大きさの微小球（総説については、Kreuter J. Controlled Release 16:169-176, 1991; CouvreurとVanthier, J. Controlled Release 17:187-198, 1991）中に取り込むことができる。

【0066】

本発明の抗炎症組成物はまた、種々の「ペースト」またはゲル形態で調製される。例えば、本発明のある実施形態において、ある温度（例えば、37℃より高い温度、例えば40℃、45℃、50℃、55℃、または60℃）では液体であり、別の温度（例えば、周囲体温、または37℃より低い任意の温度）では固体または半固体である抗炎症組成物が提供される。そのような「熱ペースト」は、本明細書に開示されたように、容易に作製される。

【0067】

本発明の別の実施形態において、室温で液体であり、注入後37℃で半固体インプラントを形成する抗炎症組成物が提供される。

【0068】

本発明のさらに別の態様において、本発明の抗炎症組成物は、フィルムとして形成される。好ましくはそのようなフィルムは一般に、5、4、3、2、または1mm未満の厚さ、さらに好ましくは0.75mmまたは0.5mm未満、および最も好ましくは500 μ m未満~25 μ mの厚さである。そのようなフィルムは好ましくは、良好な引張り強さ（例えば、50N/cm²より大きく、好ましくは100N/cm²より大きく、さらに好ましくは150または200N/cm²より大きい）を有して可撓性であり、良好な接着性（すなわち、湿った表面に容易に接着する）、および制御された透過性を有する。そのようなフィルムの代表例は、後述の実施例に記載する。

【0069】

疎水性化合物の放出のためのポリマー担体

本発明のさらなる態様において、疎水性化合物を含有し放出するように改変したポリマー担体が提供され、担体は炭水化物、タンパク質またはポリペプチドと組合せて疎水性化合物を含有する。ある実施形態においてポリマー担体は、1以上の疎水性化合物の領域、ポケット、または顆粒を含有または含む。例えば本発明のある実施形態において、疎水性化合物は、疎水性化合物を含有するマトリックス内に取り込まれ、次にマトリックスがポリマー担体内に取り込まれる。この点で種々のマトリックスを使用することができ、例えば、炭水化物および多糖（例えば、デンプン、セルロース、デキストラン、メチルセルロース、およびヒアルロン酸）、タンパク質またはポリペプチド（例えば、アルブミン、コラーゲンおよびゼラチン）がある。

【0070】

上記のポリマー担体から種々の疎水性化合物（例えば、疎水性トポイソメラーゼインヒビターを含む）を放出することができる。

【0071】

炎症性疾患の治療と予防

治療される疾患の代表例には、例えば動静脈奇形（血管奇形）における動脈血栓；過多月経；急性出血；中枢神経系障害；および脾機能亢進；炎症性皮膚疾患、例えば乾癬；湿疹性疾患（アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、湿疹）；免疫水疱性疾患；および種々の症状（特に限定されないが、慢性関節リウマチ、混合型結合組織病、シェーグレン症候群、強直性脊椎炎、ベーチェット症候群、サルコイドーシス、結晶誘導性関節炎および変形性関節炎を含む（これらのすべては、顕著な症状として腫脹した痛みのある関節が特徴である））炎症性関節炎がある。

【0072】

他の代表的疾患には、潰瘍性大腸炎およびクローン病のような炎症性腸疾患（IBD）；外科的癒着；歯周病；多嚢胞性腎症；呼吸器官の慢性炎症性疾患、例えば喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性気管支炎、喘息気管支炎、慢性閉塞性気管支炎、および肺気腫、そして慢性の気道閉塞に至る他の疾患；体の通路の閉塞に関連する疾患、例えば血管疾患、新生物閉塞、炎症性疾患、および感染症；

および目の新生血管疾患、例えば角膜血管新生、血管新生緑内障、増殖性糖尿病性網膜症、水晶体後方線維増殖症、および黄斑変性がある。

【0073】

例えば本発明の1つの態様において、本明細書に記載の抗炎症剤および組成物は、血管系の閉塞を引き起こす血管疾患を治療するのに使用される。そのような疾患の代表例には、すべての血管（任意の動脈、静脈または移植片の周りの）動脈硬化症があり、特に限定されないが、例えば：冠状動脈、大動脈、腸骨動脈、頸動脈、総大腿動脈、表面総大腿動脈、膝窩動脈、および吻合部；血管けいれん（例えば、冠状血管けいれんおよびレイノー病）；再狭窄（例えば、バルーン血管形成術、バイパス術、ステント挿入、および移植片挿入のような以前の治療部位の血管の閉塞）；炎症性および自己免疫症状（例えば、一過性動脈炎、血管炎）がある。

【0074】

本発明の他の実施態様において、体の通路の閉塞に影響を与えるかまたは引き起こす炎症性疾患を予防または治療するために、抗炎症性治療薬および組成物を使用してもよい。炎症性疾患には、種々の体の管部分の閉塞を引き起こす急性および慢性炎症がある。代表例には、血管炎（例えば、巨細胞性動脈炎（一過性動脈炎、高安動脈炎）、結節性多発性動脈炎、アレルギー性脈管炎、および肉芽腫症（チャーグ-ストラウス症候群）、多発性血管炎重複症候群、過敏性血管炎（ヘーノホ-シェーンライン紫斑病）、血清病、薬剤誘導性血管炎、感染性血管炎、新生物血管炎、結合組織障害に関連する血管炎、補体系の先天性欠陥に関連する血管炎）、ウェゲナー肉芽腫症、川崎病、中枢神経系の血管炎、バーガー病、および全身性硬化症）；胃腸管疾患（例えば、膵臓炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、潰瘍性直腸炎、1次硬化性胆管炎、特発性を含む任意の原因の良性の狭窄（例えば、胆管、食道、十二指腸、小腸または大腸の狭窄）；呼吸器官の疾患（例えば、喘息、過敏性肺炎、石綿症、ケイ肺症、および他の型の塵肺症、慢性気管支炎および慢性閉塞性気道疾患）；鼻涙管疾患（例えば、特発性を含むすべての原因の良性の狭窄）；および耳管の疾患（例えば、特発性を含むすべての原因の良性の狭窄）がある。

【0075】

本発明のさらに別の態様において、体の通路の閉塞に関連したまたはその原因である感染性疾患を治療または予防するために、抗炎症性治療薬および組成物を使用してもよい。簡単に説明すると、感染性疾患には、いくつかの急性および慢性感染性プロセスがあり、これは体の通路の閉塞を引き起こし、例えば男性生殖管の閉塞（例えば、尿道炎、副睾丸炎、前立腺炎による狭窄）、女性生殖管の閉塞（例えば、膣炎、子宮頸炎、骨盤炎症性疾患（例えば、結核、淋菌、クラミジア、腸球菌、および梅毒））；尿路閉塞（例えば、膀胱炎、尿道炎）；呼吸器管の閉塞（例えば、慢性気管支炎、結核、他のマイコバクテリウム（*Mycobacterium*）感染（MAIなど）、嫌気性感染、真菌感染、および寄生中感染）；および心血管閉塞（例えば、真菌性動脈瘤および感染性心内膜炎）がある。例えば、プルムバギン、メナジオン、 β ラパコンなどのナフトキノンは、抗菌性を有することが知られている。

【0076】

インプラント（例えば、ステント）のための種々の手術器具は、本明細書に記載の任意の抗炎症剤で被覆されるかまたはこれを含有および／もしくは放出するように作製してもよい。代表例には、心血管用器具（例えば、インプラント可能な静脈カテーテル、静脈ポート、トンネル静脈カテーテル、持続注入ラインまたはポート、例えば、肝動脈注入カテーテル、ペースメーカーワイア、インプラント可能な除細動器）；神経／神経手術用器具（例えば、心室腹膜シャント、心室動脈シャント、神経刺激器具、硬膜パッチ、および硬膜外繊維症椎弓切除後を防ぐための器具、連続的クモ膜下注入のための器具）；胃腸管用器具（例えば、持続留置カテーテル、栄養チューブ、門脈体静脈シャント、腹水シャント、薬剤送達のための腹膜インプラント、腹膜透析カテーテル、ヘルニアのためのインプラント可能メッシュ、外科的癒着を防ぐための懸濁物または固体インプラント（メッシュを含む））；尿生殖器用器具（例えば、子宮インプラント（子宮内器具（IUD）および子宮内膜肥厚を防ぐための器具を含む）、卵管インプラント（可逆性断種器具を含む）、卵管ステント、失禁のための人口括約筋および尿道周囲インプラント、尿管ステント、持続留置カテーテル、膀胱増強、または精管吻合術

のためのラップまたは副子) ; 眼科用インプラント (例えば、血管新生緑内障のためのマルチノ (multino) インプラントおよび他のインプラント、翼状片 (pterygiums) のための薬剤溶出性コンタクトレンズ、失敗したダクロシスタルライノソトミイ (dacryostalarhinostomy) のための副子、角膜血管新生のための薬剤溶出性コンタクトレンズ、糖尿病性網膜症のためのインプラント、ハイリスク角膜移植のための薬剤溶出性コンタクトレンズ) ; 耳鼻咽喉用器具 (例えば、小骨インプラント、経側頭ドレインの代替としてのグルーイア (glue ear) または慢性耳炎のための耳管福祉またはステント) ; 形成外科インプラント (例えば、胸筋下または腺下アプローチまたは乳房切除後のゲルもしくは食塩水含有乳房インプラントに応答する繊維性拘縮の防止、またはオトガイインプラント) 、および整形外科用インプラント (例えば、固めた整形外科用人工器官) がある。

【0077】

本明細書に記載の抗炎症剤を含有および／または放出させるために、種々のステント (食道ステント、胃腸管ステント、血管ステント、胆管ステント、大腸ステント、膵臓ステント、尿管および尿道ステント、涙腺ステント、耳管ステント、卵管ステント、鼻腔ステント、副鼻腔ステント、および気管／気管支ステントを含む) を作製することができる。ステントは市販品が容易に入手できるし、または公知の方法に従って作製してもよい。ステントの代表例には、米国特許第4,768,523号、標題「ヒドロゲル接着剤」 ; 米国特許第4,776,337号、標題「膨張性腔内移植片、および膨張性腔内移植片をインプラントするための方法と装置」 ; 米国特許第5,041,126号、標題「血管内ステントと送達システム」 ; 米国特許第5,052,998号、標題「留置ステントと使用法」 ; 米国特許第5,064,435号、標題「安定な軸長さを有する自己膨張性人工器官」 ; 米国特許第5,089,606号、標題「医学的応用のための水不溶性多糖ヒドロゲル泡状物」 ; 米国特許第5,147,370号、標題「中空導管のためのニチノールステント」 ; 米国特許第5,176,626号、標題「留置ステント」 ; 米国特許第5,213,580号、標題「生分解性ポリマー腔内シーリング法」 ; および米国特許第5,328,471号、標題「中空管状臓器と他の組織の管腔の限局性疾患の治療のための方法と装置」に記載のようなものがある。

【0078】

長期静脈アクセスのために、静脈アクセス器具、例えば外部トンネルカテーテル（例えば、Hickman（登録商標）／Broviac（登録商標）およびGroshong（登録商標））およびインプラントポートが一般的に使用され、また本発明の抗炎症因子を含むように作製される。そのような器具はまた、硬膜外カテーテルと末梢挿入中心カテーテル（PICCs）を含む。感染は、硬膜外カテーテル（Williamsら、1990）を含むすべての型のアクセス器具の合併症（Ascherら、1993；DeckerとEdwards, 1988；Earlyら、1990；Lamら、1994；Pressら、1984；Raadら、1993）であり、外科的癒着または再狭窄の可能な問題でもある。すなわち、抗生物質活性も有する本発明の抗炎症因子の選択が好ましいであろう。

【0079】

外科的癒着

外科的癒着に対する薬理学のおよびバリア治療の総説は、Wiseman D.: ポリマー部位特異的薬理学における外科的癒着の防止のためのポリマー、Domb. A.J.編、1994：ジョン・ワイリー・アンド・サンズ（John Wiley and Sons Ltd.）に見いだされる。外科的癒着は、手術中に露出した組織領域の間で形成されるきずあとである。これらの癒着は、任意の空洞でかつ多くのタイプの組織間で形成される。しばしばこれらの癒着は、手術部位により正常な組織または臓器機能を阻害することがある。腹部の手術により、小腸の閉塞を引き起こす小腸ループ癒着が起きることがある。婦人科手術は、骨盤構造の間で癒着形成を頻繁に引き起こす。腱への手術はしばしば、腱とグライドシース（glide sheath）の間で癒着が形成される。心臓手術では、心臓、大動脈、および胸骨の間で癒着が形成されることがある。脊髄の手術では、硬膜と神経根は、近くの構造体に癒着することがある。癒着の問題がある他の手術は、頭蓋手術と目の手術である。

【0080】

外科的癒着は、外傷後の炎症ときずあと形成から生じ、ここで出血は、フィブリンの供給源となり、これは隣接組織との接着物質になりこれを癒着させる。フィブリンが除去されないと、マクロファージ、繊維芽細胞、および血管（血管形成）がフィブリンに進入してフィブリン癒着が永久的になる。最終的に、コラーゲンおよび同様の結合組織が沈着して、永久的癒着が形成される。

【0081】

組織ゾーン間の物理的バリアとして作用するフィルムの使用は、外科的癒着を少なくするための最も一般的な治療法である。今日まで、外科的癒着を防ぐための薬剤の使用は、わずかな有効性を示しているにすぎない。癒着形成のプロセスは、炎症ならびに細胞増殖と血管形成の側面が関与する。すなわち、トポイソメラーゼインヒビターは、癒着を防ぐのに有効に使用できるかも知れない。これらの物質の使用に起因する全身性毒性があるため、かつ局在的治療のみが必要であるため、これらの物質は、手術部位に癒着する生体適合性マトリックス（例えば、ムコ接着性）中に置くことが好ましい。次にこれらの調製物は、数日間にわたって化合物を放出して、癒着形成に関与する炎症プロセスを阻害し、正常な創傷治癒を可能にする。10%グリセロールの添加で可撓性にされ、2mM EDAC（水溶性カルボジイミド）で架橋したヒアルロン酸フィルムは、ムコ接着性の生体適合性フィルムであり、いかなる毒性を誘導することもなく、はく離した手術部位に適用される。カンプトテシンを含有するフィルムは、ラット（ $n=8$ ）で毒性を伴うことなくほとんど完全に腹部癒着形成を阻害する。エトポシド、 β ラパコンおよびドキソルビシンを含有するフィルムは、毒性副作用を誘導せず、癒着形成の阻害がこれらの化合物で起きる。このフィルムは、制御された方法で薬剤を放出した。

【0082】

調製、投与および試験

本発明の抗炎症剤は、種々の形態（例えば、微小球、ペースト、フィルム、スプレー、軟膏、クリーム、ゲルなど）で調製される。さらに本発明の組成物は、2以上の抗炎症剤を含有するように、種々の追加の化合物を含有するように、特定の物理的性質（例えば、弾性、特定の融点、または特定の放出速度）を有するように、調製される。組成物は、所望の作用を獲得できるように組合せてもよい（例えば、いくつかの微小球調製物を組合せて、1以上の抗炎症剤の迅速かつ長期の放出を達成する）。

【0083】

抗炎症剤のポリマー調製物は、単独で、または薬剤学的にまたは生理学的に許

容される担体、賦形剤、または希釈剤と組合せて投与される。一般にそのような担体は、使用される投与量と濃度で受容者に対して非毒性でなければならない。通常そのような組成物の調製物は、治療薬のポリマー調製物を、バッファー、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、低分子量（約10未満のアミノ酸残基）ポリペプチドとタンパク質、アミノ酸、炭水化物（グルコース、ショ糖またはデキストリンを含む）、キレート剤（例えば、EDTA）、グルタチオン、および他の安定化剤と賦形剤と、組合わせる。中性の緩衝化食塩水または非特異的血清アルブミンと混合した食塩水は、適当な希釈剤の例である。

【0084】

本明細書に記載の抗炎症剤、組成物、または医薬組成物は、種々の異なる経路で投与（例えば、経口、鼻内、炎症部位に局所的に、直腸内、頭蓋内、クモ膜下、鼻腔内、眼内、関節内、皮下、腹腔内、筋肉内、舌下、および膀胱内）できるように調製される。他の代表的な投与経路には、疾患部位への直接投与（好ましくは、超音波、CT、透視、MRI、または内視鏡ガイダンスを用いて）がある。

【0085】

所与のトポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を測定するのに、種々の方法が容易に利用できる。これらには、培養中の細胞増殖の阻害をモニターする *in vitro* 細胞培養法があり、例えば実施例1に詳述される方法がある。あるトポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を測定するのに、種々の *in vivo* 法を使用することもできる。例えば、ラットの再狭窄モデルでは、血管形成傷害後の頸動脈を利用する。

【0086】

細菌などに対する食作用応答は、慢性炎症性状態、特に自己免疫成分を伴う疾患（例えば、多くの型の関節炎、多発性硬化症など）で大きな問題となりうる。大量の好中球が、腫脹した部位（例えば、関節炎における滑膜の連結部分）に入り、炎症を悪化させる原因となる。MSUMまたはCPPD結晶による好中球の活性化は、結晶誘導性の関節炎（例えば、痛風または偽性痛風）で起きる炎症の原因である（McCarthy DJ編、Arthritis and Allied Conditions, フィラデルフィア：LeaとFebigar, 1985）。本発明は、結晶誘導性の関節炎患者を、例えば調製物の関

節内注入により治療するのに使用できる、抗炎症因子とポリマー担体とを含む組成物を提供する。

【0087】

好中球に関して所与のトポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を測定するのに、種々の方法が容易に利用できる（例えば、*in vitro*好中球活性化アッセイ）（例えば、Jackson JK, J. Rheumatology, 24:341-348, 1997）。好中球に対する抗炎症活性を測定するのに使用できる他の型のアッセイは、アポトーシスアッセイである。

【0088】

所与のトポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を測定するのに使用できる別の方法は、培養した軟骨細胞中のインターロイキン-1誘導性コラゲナーゼ遺伝子およびストロメリシン遺伝子発現に及ぼすその因子の作用である。この*in vitro*アッセイは、慢性関節リウマチの病態生理の中期をモデルとし、ここではリンパ球への抗原提示後に、インターロイキン-1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF) が関節中に放出される。これらのサイトカインは、軟骨細胞からのメタロプロテイナーゼ（例えば、コラゲナーゼおよびストロメリシン）の産生と分泌を誘導し、こうして、血管形成、滑膜炎、パンヌス形成、および軟骨破壊を引き起こす。

【0089】

所与のトポイソメラーゼインヒビターの抗血管形成活性を測定するのに、種々の方法が使用でき、例えばヒヨコ漿尿膜 (CAM) アッセイがある。血管形成は、しばしば炎症性疾患の後期に存在する増殖物質に、血液がアクセスすることを可能にする。例えば慢性関節リウマチでは、増殖する滑膜細胞によるパンヌスマス形成は、この疾患の後期、慢性期に起きる (Jackson, J.R.ら、J. Pharmacol and Exp. Therapeutics, 284(2) P 987, 1998参照)。同様に、初期の癒着が形成した少し後に、繊維芽細胞がフィブリンに浸潤する時、外科的癒着で血管形成が起きる。すなわち、血管形成のみを標的とする治療法のみでは、これらの疾患の明らかに可能性のある治療法ではない。例えば、抗癌剤であるクルクミンは、多くの型の細胞の増殖を阻害することができ (Gautum, S.C.ら、Biochemical Pharmacology, 55(8), 1333-1337, 1998参照)、血管形成のインヒビターである (Ar

biser, J.L.ら、Molecular Medicine 4, p 376-383, 1998)。しかし、炎症プロセスに参与する2つのプロセスを明らかに阻害できるにもかかわらず、この薬剤は、本明細書の例で示すように、ラットの外科的癒着形成に対して何の阻害作用もなかった。

【0090】

以下の例は、例示のためであって、決して本発明を限定するものではない。

【0091】

実施例

実施例 1. in vitroで滑膜細胞と平滑筋細胞増殖に及ぼすカンプトテシンの作用
増殖は、MTT増殖／細胞障害性アッセイを使用して測定した。

【0092】

1 日目に、1500～2000の平滑筋細胞（A7r5ラット胚の胸大動脈）または滑膜細胞（HIG.82ウサギ）を、96ウェルプレート上の各ウェルに蒔き、最初の列は細胞を入れなかった（ブランク）。プレートを、37℃のCO₂ インキュベーターに戻した。翌日、カンプトテシンを種々の濃度で加えた。最初の列（ブランク）と、対照としての第2の列（未処理の列）にはこの薬剤を加えなかった。細胞を、24、48、および72時間暴露した。暴露期間の最後に、培地に溶解した50 μ lのジメチルチオアゾールジフェニルテトラゾリウムブロミド塩（MTT）を加え、37℃で4時間インキュベートした。次に培地を吸引し、200 μ lのジメチルスルホキシドを加えた。プレートを30分揺動し、562nmで吸光度を読んだ。既知数の細胞による光学密度の標準プロットを使用して、光学密度測定値を細胞数に変換し、細胞の生存能力を%増殖（この値は、対照細胞の%である）として表した。同じ方法を使用して、細胞を以下の化合物に48時間暴露した： β ラパコン、エトポシド、ドキソルビシン、ジュグロン、プルムバギンおよびメナジオン。

【0093】

図1に示すように、滑膜細胞と平滑筋細胞についてカンプトテシンは48時間の暴露後に、細胞増殖の濃度依存性阻害を誘導した。増殖に50%の作用を示す阻害濃度（IC₅₀）は、それぞれ65nMと1.6 μ mであった。カンプトテシンに両方の細胞系をより長時間暴露すると、より大きな増殖阻害を示した。暴露時間を2日間か

ら4日間に増やすと、増殖阻害は両方の細胞系について約40%上昇した。それぞれ100nMまたは50nMのカンプトテシンに、24、48、72、および96時間暴露した滑膜細胞と平滑筋細胞は、カンプトテシンへ暴露の長期が薬剤の抗増殖作用を増幅することを示す。

【0094】

エトポシドと β ラパコンの両方とも、滑膜細胞と平滑筋細胞のそれぞれについて、48時間の暴露後に濃度依存性の細胞増殖阻害を誘導した。滑膜細胞の増殖に50%の作用を示した阻害濃度は、 $5.6\mu\text{M}$ (β ラパコン) 及び(約) $15\mu\text{M}$ (エトポシド) であった。平滑筋細胞の増殖に50%の作用を与えた阻害濃度は、 $6.3\mu\text{M}$ (β ラパコン) および(約) $15\mu\text{M}$ (エトポシド) であった。このデータは、これらのトポイソメラーゼインヒビターが、強力な抗増殖物質であることを示す。

【0095】

ドキソルビシン、ジュグロン、プルムバギン、およびメナジオンはすべて、滑膜細胞と平滑筋細胞のそれぞれについて、48時間の暴露後に、濃度依存性の細胞増殖阻害を誘導した。滑膜細胞の増殖に50%作用を示す阻害濃度は、100nM (ドキソルビシン)、 $4.3\mu\text{M}$ (ジュグロン)、 $3.6\mu\text{M}$ (プルムバギン) および $15\mu\text{M}$ (メナジオン) であった。平滑筋細胞の増殖に50%作用を与える阻害濃度は、600nM (ドキソルビシン)、 $2\mu\text{M}$ (ジュグロン)、 $2.6\mu\text{M}$ (プルムバギン) および $8.2\mu\text{M}$ (メナジオン) であった。これは、これらのトポイソメラーゼインヒビターが、強力な抗増殖物質であることを示す。

【0096】

実施例2. 関節炎のin vitroモデルにおけるカンプトテシン及び他のトポイソメラーゼインヒビターの抗炎症作用：好中球におけるアポトーシスの誘導

多くの型の関節炎に関連する炎症は、ヒトの滑膜関節中にある多数の免疫細胞(例えば好中球)の存在により生じると考えられている。結晶誘導性関節炎に関連する長引く炎症は、滑膜関節中の好中球と結晶との相互作用により生じる。この疾患で炎症の期間が長引く理由は、結晶による好中球アポトーシスの阻害が原因とも考えられる。この阻害は、好中球を、より長期間関節中に残存させる結果になるかも知れない。従って、この結晶により誘導される好中球アポトーシスの

抑制を克服することができる化合物は、炎症の適切な低下を伴って、関節からのこれらの細胞のより急速なクリアランスを可能にする。アポトーシスのプロセスは、エンドヌクレアーゼによって進められるDNAの断片への切断が関与し、これは、アガロースゲル電気泳動実験でバンドのラダーとして視覚化される。使用することができる他のアッセイには、カスパーゼ (caspase) 3 定量または細胞質DNA濃度の測定がある。簡単に説明すると、カスパーゼ3は、アポトーシス細胞中で高度に活性化されるアポトーシス性切断酵素であり、その結果、活性レベルの上昇が、活性アポトーシスを示す。アポトーシスの進行に伴って細胞核中でDNAが切断され始めると、切断断片の一部は、細胞の細胞質中に拡散することができ、細胞質中の断片化したDNAの上昇した濃度は、アポトーシスを示す。カスパーゼ活性レベルを阻害するかまたは細胞質DNAを低下させる物質は、生存促進性（炎症の可能性）であり、促進する物質は、アポトーシス促進性であり、抗炎症性である。これらの方法の使用と好中球の作用を受けた炎症におけるその役割は、Tudanら, J. Rheumatol. 27 p 2463-72, 2000に詳述されている。

【0097】

方法：180塩基対のアガロースゲルバンディング／ラダリング：標準的方法（デキストラン沈降とフィコールペーク遠心分離）により、新鮮なヒト血液から好中球を分離し、バッファーに 1×10^6 細胞/mlで懸濁した。次に細胞をピロリン酸カルシウム2水和物（CPPD）の結晶と、37℃で1時間インキュベートした。次に細胞を、カンプトテシン（ $0.1 \mu\text{M}$ ）有りまたは無しで37℃で4時間インキュベートした。種々の条件からの好中球アリコート（ 1×10^6 細胞）を、 $480 \mu\text{l}$ の溶解バッファー（0.6% SDS、10mM トリス、1 mM EDTA (pH7.0)）に再懸濁し、激しく混合後、5MのNaClを $120 \mu\text{l}$ 添加後20分間氷上に放置した。カスパーゼ3とDNA断片化アッセイでは、より穏やかな界面活性剤（トリトン）を使用して、細胞の原形質膜のみを溶解して、細胞質含量（カスパーゼ3またはDNA断片）を測定することができた。サンプルを14,000rpm で4℃で20分間沈降させた。ペレットを乾燥し、フェノール：クロロホルムに再懸濁した。 $450 \mu\text{l}$ の上層を新しい試験管に移し、次にこれに $950 \mu\text{l}$ の冷10%エタノールを加え、-20℃に10分間維持した。14,000rpm（4℃）でDNAを沈降させ、ペレットを乱すことなく、75%エタノ

ールで注意深く洗浄した。DNAを37℃で乾燥し、次に20 μ lのサンプルバッファー (1 μ lの1ng/ml RNaseA (ファルマシア (Pharmacia)) を有する50%TBE) 中に再懸濁した。サンプルをボルテックス混合し、37℃で10分間放置した。5 μ lの充填色素 (20%フィコールペーク (ファルマシア (Pharmacia))、0.1%プロモフェノールブルー、0.1%キシレンシアノール) を加えた。2%アガロース、80mAで電気泳動を行い、次にゲルを臭化エチジウム (ファルマシア (Pharmacia)) で染色し、UV照射下で写真を撮った。

【0098】

カスパーゼ3活性化は、この酵素の市販のキット (caspACEアッセイ系、プロメガサイエンティフィック (Promega Scientific)) を使用して測定し、細胞質DNAは、市販のキット (細胞死滅検出ELISA-ベーリンガー-マンハイム (Boehringer-Mannheim)) を使用して測定した。

【0099】

結果：好中球アポトーシスに関連したDNAラダリングを、UV照射下でゲルの一連の光で着色したバンドで視覚化した。これらの実験で、対照細胞は、絶えず若干のバックグラウンドDNAラダリングを示した。このラダリングは、結晶誘導性アポトーシスの抑制に一致して、結晶単独でインキュベートした細胞中で抑制された。カンプトテシン単独でインキュベートした細胞は、好中球中のアポトーシスの誘導に一致して、広範なDNAラダリングを示した。同様に、まず結晶でインキュベートし次にカンプトテシンに暴露した細胞はまた、広範なアポトーシスを示した。他の実験では、カンプトテシンは高レベルのカスパーゼ3の活性化を誘導し、DNA断片の細胞質レベルを上昇させた。これは、カンプトテシンは好中球中のアポトーシスを誘導することができる (結晶の存在下でも) ため、これは関節炎の治療のための抗炎症剤であることを示す。この薬剤は、関節炎患者の関節からのこれらの免疫細胞が関与する、炎症部位からの好中球のクリアランス速度を増加させることが期待される。

【0100】

カスパーゼ3と細胞質DNAアッセイを使用して、他のトポイソメラーゼインヒビター (エトポシド、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ノガラマイシン、お

よび β ラパコン)で処理した好中球を評価した。すべての物質が、カスパーゼ3の活性化レベルの上昇を誘導した。細胞質DNA断片化アッセイにおいて、好中球のエトポシド、ドキシソルビシンおよびミトキサントロン処理は、細胞質DNAの大幅な増加を引き起こした。

【0101】

実施例3. 好中球化学発光に及ぼすトポイソメラーゼインヒビターの作用

新に調製したヒト好中球を化合物とインキュベートし、次に、血漿でオプソニン化したCPPD結晶、細菌化学走性誘因物質であるfMLP、またはホルボールエステルであるPMAにより、細胞を刺激した。細胞の刺激(または活性化)は、スーパーオキシドアニオン生成を誘導し、これは、発光(化学発光)により測定した。次に、好中球機能の阻害を、化学発光の阻害により測定した。この試験の間中、ハンクス緩衝化塩溶液(HBSS) pH7.4を使用した。すべての化学物質は、特に明記しない場合は、シグマケミカル社(Sigma Chemical Co.) (セントルイス、ミズーリ州)から購入した。すべての操作は、特に明記しない場合は37℃で行った。CPPD(三斜晶系)結晶を調製し、既に記載されている(Jackson JKら、J Rheumatol, 24:341-348, 1996)ように性状解析した。結晶のサイズ分布は、10mm未満が約33%、10~20mmが38%、そして20mmより大きいものが9%であった。50%のヘパリン化血漿と、1mlの50%血漿中50mgのCPPD濃度を使用して、結晶のオプソニン化を行った。結晶を希釈血漿と37℃で30分インキュベートし、1000×gで遠心分離し、次にHBSS中で洗浄し、再遠心分離した。新に採取したヒトのクエン酸化全血から、好中球を調製した。簡単に説明すると、400mlの血液を、HBSS中4%デキストランT500(ファルマシアLKB(Pharmacia LKB)、バイオテクノロジーAB、ウプサラ、スウェーデン)80mlと混合し、1時間沈降させた。連続的に血漿を採取し、5mlを、15mlポリプロピレン試験管(コーニング(Corning)、ニューヨーク州)中の5mlのフィコールペーク(ファルマシア(Pharmacia))に適用した。500×gで30分遠心分離した後、20sの低張ショックで好中球ペレットを洗浄して赤血球を無しにした。好中球をHBSSに再懸濁し、氷上に維持し、3時間以内に実験のために使用した。好中球の生存能力と純度は、絶えず90%より大きかった。

【0102】

薬剤のストック溶液をDMSOで希釈して、種々の濃度の薬剤を得た。等量のこれらの溶液を、静かにボルテックス混合しながら 5×10^6 細胞/mlで好中球に加えて、最終DMSO濃度0.25%を達成した。このDMSO濃度は、対照細胞の応答に何の影響もなかった。細胞を37℃で15分間インキュベートした後、結晶、fMLPまたはPMAに加えた。

【0103】

CPPD (50mg/ml) を有するHBSS中 5×10^6 細胞/mlの細胞濃度で、化学発光試験を行った。すべての実験で、0.5mlの細胞を、1.5mlのエッペンドルフ試験管中で25mgのCPPDまたは1 μ MのfMLP（および0.5 μ MのサイトカラシンB）または0.5 μ MのPMAに加えた。試験管に、HBSS中25%DMSOに溶解した10 μ lのルミノールを加えて、1 μ Mの最終濃度を得て、サンプルを混合して、好中球活性化を開始した。化学発光は、測定の直前にシェイクして結晶を再懸濁して、37℃でLKBルミノメータ（モデル1250）を使用して、モニターした。対照試験管は、細胞、薬剤およびルミノールを含有した（結晶は存在しない）。

【0104】

β ラパコンは、図2(A-C)に示すように、3つのすべてのアゴニストによる好中球活性化を強力に阻害した。この薬剤のIC₅₀は、3つのアゴニストについて1~10 μ mの範囲であった。このデータは、1,2ナフトキノントポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を示す。ブルムバギンは、3つのすべてのアゴニストによる好中球活性化を強力に阻害した。この薬剤のIC₅₀は、3つのアゴニストについて1 μ g/ml未満であった。メナジオンは、MSUM結晶による好中球活性化を強力に阻害した。この薬剤のIC₅₀は、0.5~1 μ g/mlの範囲であった。ジュグロンは、MSUM結晶による好中球活性化を強力に阻害した。この薬剤のIC₅₀は、0.5~1 μ g/mlの範囲であった。このデータは、1,4ナフトキノントポイソメラーゼインヒビターの抗炎症活性を証明する。

【0105】

カンプトテシン、エトポシドおよびドキソルビシンは、化学発光により測定すると、好中球活性化の阻害が1,2ナフトキノンや1,4ナフトキノンより弱かった。

低いミクロモル濃度では、阻害は：エトポシド ($10\mu\text{M}$)、25%；ドキソルビシン ($10\mu\text{M}$)、13%；およびカンプトテシン (5%)、2%であった。

【0106】

実施例4. 好中球スーパーオキシドアニオン生成に及ぼすプルムバギンの作用

スーパーオキシドアニオン濃度は、チトクロムCアッセイのスーパーオキシドジスムターゼ阻害性低下を使用して、測定した。25mgのfMLPの結晶（最終濃度 $1\mu\text{M}$ で、サイトカラシンBを $0.5\mu\text{M}$ ）を、1.5mlのキャップ付きエッペンドルフ試験管に入れ、 37°C に加熱した。試験管に、 37°C で0.5mlの細胞とフェリチクロムC（ウマ心臓、3型）（最終濃度 1.2mg/ml ）を入れ、キャップをした試験管を振盪して細胞を活性化した。適切な時間に、試験管を $10,000\times g$ で10秒間遠心分離し、上清を採取して、550nmで分光光度アッセイを行った。対照試験管を同じ条件で、スーパーオキシドジスムターゼを600単位/mlで含有させて準備した。図3に示すように、プルムバギンは、CPPD結晶またはfMLPにより活性化された好中球からの、スーパーオキシドアニオンの生成を阻害した。このデータは、トポイソメラーゼインヒビターであるプルムバギンの抗炎症活性を証明している。

【0107】

実施例5. 好中球脱顆粒に及ぼすプルムバギンの作用

25mgのCPPDまたは $1\mu\text{M}$ のfMLP（ $0.5\mu\text{M}$ のサイトカラシンBを含む）を含有するエッペンドルフ試験管を、 37°C で維持した。試験管に、 37°C で0.5mlの細胞を加え、次に攪拌して反応を開始させた。適切な時間に、試験管を $10,000\times g$ で10秒間遠心分離し、後のアッセイのために0.4mlの上清を -20°C で保存した。ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性は、o-ジアニシジンの酸化に伴う450nmの吸光度の上昇により測定した。ジアニシジン（7.8mg）を、100mlの0.1Mクエン酸バッファー（pH5.5）に溶解し、1mlキュベットに0.89mlのジアニシジン溶液を加え、次に50mlの1%トリトンX100、10mlの0.05%過酸化水素、および50mlの結晶—細胞上清を加えた。MPO活性は、以下の関係：ジアニシジンの酸化（nmol/分） $= 50 \Delta A_{450}$ を使用して、1分あたりの吸光度（450nm）の変化（ ΔA_{450} ）から決定した。

【0108】

図4のミエロペルオキシダーゼ放出の阻害により示すように、プルムバギンは

、CPPD結晶とfMLPに応答して、好中球脱顆粒を阻害した。このデータは、トポイソメラーゼインヒビターであるプルムバギンの抗炎症活性を証明する。

【0109】

実施例6. 好中球生存能力に及ぼすプルムバギンの作用

好中球生存能力に及ぼす薬剤の作用を調べるために、細胞質マーカー酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を、既に記載されている (Jackson JKら、J Rheumatol, 24:341-348, 1996) ように測定した。プルムバギン (結晶は存在しない) とともに細胞を含有する対照試験管を、LDHについて測定した。細胞中の総LDH濃度をトリトン溶解により測定すると、3000IU (およそ) であった。放出されたLDHの対照レベルは、250IU未満であった。プルムバギンで処理した細胞は、約150~250IUのLDHを放出した。このデータは、実施例3に記載のようにプルムバギンの抗炎症作用は、プルムバギンの非特異的細胞障害性作用により生じるのではないことを証明する。

【0110】

実施例7. IL-1誘導性のコラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現に及ぼすカンプトテシンと他の化合物の作用

このアッセイは、2つのメタロプロテイナーゼ (コラゲナーゼとストロメリシン) について、RNAのレベルを測定する。これらの遺伝子の過剰発現により、関節性軟骨からこれらの2つの酵素が過剰合成されて過剰分泌され、これは、リウマチ様関節炎の病態生理の一部である可能性がある。コラゲナーゼとストロメリシンの過剰発現を阻害する物質は、抗関節炎物質となり得る。この抗関節炎物質の可能性は、この物質がまたプロテオグリカン遺伝子発現を強く阻害する場合には、小さくなる。プロテオグリカン遺伝子発現は、軟骨細胞の正常な生理の一部である。

【0111】

1次軟骨培養物を、子牛軟骨から新たに単離した。細胞を、100×20mmの培養皿に蒔き (2.5×10^6 /mlで)、5%胎児牛血清 (FBS) を含有するHam's F12培地中で37℃で一晩インキュベートした。細胞を無血清培地で一晩枯渇させた。細胞を、 10^{-6} M、 10^{-7} M、および 10^{-8} M濃度のカンプトテシンで、6時間前処理した。次に

IL-1 (20ng/ml) を各プレートに加え、プレートをさらに18時間インキュベートした。総RNAを、酸性化グアニジンイソシアネート方法により単離し、変性ゲル上で電気泳動を行った。変性RNAサンプル (15 μ g) を、1%変性ゲル中のゲル電気泳動により分析し、ナイロン膜に移し、それぞれ 32 P 標識コラゲナーゼ cDNA プロブ、 32 P 標識ストロメリシン cDNA プロブ、 32 P 標識プロテオグリカン cDNA プロブ、および 32 P 標識グリセラルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (PAGDH) cDNA とハイブリダイズさせた。PAGDH レベルは、ほぼ等しい充填物を確認するための内部標準である。X線フィルム上の実験結果をスキャンし、HPスキャンジェットで分析した。図5に示すように、カンプトテシンは、プロテオグリカン発現を過剰に阻害することなく、 1×10^{-7} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を、ほぼ完全に阻害した。このデータは、カンプトテシンの抗炎症作用を証明する。

【0112】

エトポシドは、プロテオグリカン発現を過剰に阻害することなく、 1×10^{-5} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を阻害した。 β ラパコンは、プロテオグリカン発現を過剰に阻害することなく、 1×10^{-5} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を、ほぼ完全に阻害した。図6に示すように、メナジオンは、プロテオグリカン発現を過剰に阻害することなく、 1×10^{-5} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を、阻害した。このデータは、リウマチ様関節炎の治療におけるこれらの薬剤の抗炎症作用を証明する。

【0113】

ドキシソルビシンは、 1×10^{-5} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を、完全に阻害した。しかし、この濃度ではプロテオグリカン発現の強い阻害があった。 1×10^{-6} M の濃度のドキシソルビシンでは、プロテオグリカン発現を過剰に阻害することなく、ストロメリシン発現の部分的阻害があった。プルムバギンは、 1×10^{-5} M の濃度で IL-1 誘導性コラゲナーゼ遺伝子とストロメリシン遺伝子発現を、完全に阻害した。しかし、この濃度ではプロテオグリカン発現の完全な阻害があった。 1×10^{-6} M の濃度のプルムバギンでは、プロテオグ

リカン発現を過剰に阻害することなく、ストロメリシン発現の部分的阻害があった。このデータは、リウマチ様関節炎の治療におけるドキソルビシンとプルムバギンの抗炎症可能性を証明し、これらの薬剤について $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-6}$ Mの濃度での治療的ウィンドウを示唆する。

【0114】

実施例8. ヒヨコ胚の漿尿膜における血管形成に及ぼすトポイソメラーゼインヒビターの作用 (CAMアッセイ)

受精したニワトリの卵を地方の孵化場から得て、自動回転機を備えた孵卵器中に37℃で3.5日間入れた後、殻の除去と窓形成を行った。

【0115】

無菌パラフィン紙のシートを空中に作成した窓の上に置いて、卵内容物の汚染と脱水を防いだ。これらのシート (4cm×4cm) を、70%エタノールを噴霧して滅菌し、層流フード内で乾燥させた。3日後、卵をインキュベーター内で手で回転させ、その鋭い端が5～10分間上を向くようにして、卵の中身が内膜から離れるようにした。70%エタノールとキムワイプを使用して、卵の殻全体を拭いてきれいにし、卵の外側を清潔にした。層流フードの内側で、とがっていない方を上にして卵を置き、ピンセットの端で殻に注意深くヒビを入れて、卵のとがっていない方の端に穴をあけた。殻のくずをピンセットで静かに除去して、とがっていない方の端に穴をあけた。内膜を傷つけないようにしながら、この丸い穴を直径2～3cmの大きさにした。殻に穴を作成したら、漿尿膜 (CAM) (これは、黄身と成長するヒヨコ胚を収容する) を傷つけないように注意しながら、内部の殻の膜 (これは、卵の中身を収容する) を静かに裂き、ピンセットで除去した。次にパラフィルムを静かに伸ばして、穴を無菌パラフィルムのシートでカバーし、次に穴の周りにおいた。次に卵をインキュベーター (37℃) 中の卵ラックに入れ、回転を防ぐようにして置いた。6日後、各卵を、インキュベーターから1つずつ取り出し (とがっていない方の端を上にして)、窓を覆うパラフィルムを除去して、CAMに直接アクセスできるようにし、これは、胚の後腸に由来する。薬剤を充填したポリマーを、CAMの増殖する毛細管床に置いた。次にパラフィルムシートで卵の内容物を再シールし、37℃インキュベーター中に戻した。8日後、CAM血管系

の分析を記録した（薬剤をCAM毛細管床の上に置いた48時間後）。CAMに及ぼす薬剤の作用を、無血管スケール（これは、薬剤の作用を0、1、2、または3として等級を付ける）を使用して等級を付けた。無血管スケールの値は、以下を説明する：

- 0 抗血管形成活性無し
- 1 微細血管減少
- 2 薬剤ペレットの大きさ（直径2mm）である小さい無血管ゾーン
- 3 直径4～5mmの無血管ゾーン。

【0116】

表1に示すように、カンプトテシンは、CAMアッセイにおいて血管形成の広範な阻害を誘導した。対照PCLペレット（カンプトテシン無し）で処理したすべてのCAMは、血管系の完全な成長を示した。0.5%（PCLに対してw/w）という低い濃度のカンプトテシンでは、血管形成の阻害の強い証拠があり、5%濃度では、29のCAMで完全なまたは部分的な阻害があり、3つのCAMのみが正常な血管系を示した。

【0117】

【表1】

表1：カンプトテシンの血管形成活性

各列の数字は、血管形成阻害無し、部分的阻害、または最大阻害を示す、卵（CAM）の数を示す。

薬剤濃度	血管形成活性		
	無し（0）	部分的（1）	最大（3）
カンプトテシン0.1%	7	1	
カンプトテシン0.5%	8	12	2
カンプトテシン1.0%	4	6	-
カンプトテシン5.0%	3	20	9
対照	20	-	-

このデータは、カンプトテシンの血管形成の可能性を示し、ポリマー性の徐放製剤は、不当な毒性を誘導することなく治療的に有効濃度の薬剤を放出する有効

な方法であることを証明する。

【0118】

表2は、試験したすべての化合物の結果を要約する。4%、8%、15% (PCLに対してw/w) の濃度のエトポシドと、代替ポリマーペレット (10%メトキシポリエチレングリコールを有するPCL) 中の10%の濃度のエトポシドは、試験したほとんどすべてのCAMで血管形成を阻害した。ほとんどのCAMは部分的阻害を示し、5つのCAMは完全な阻害を示した。0.5%~5% (PCLに対してw/w) の濃度のドキソルビシンは、1つを除くすべてのCAMで血管形成を阻害した。5%のドキソルビシンで処理したCAMは、部分的~完全な血管形成阻害を示した。PCL中1%、4%または6%(w/w)または代替ポリマーペレット (10%メトキシポリエチレングリコールを有するPCL) 中の4%の濃度の β ラパコンは、ほとんどすべてのCAMで血管形成を阻害した。6%の β ラパコンで処理したCAMは、血管形成の部分的~完全な阻害を誘導した。プルムバギンとメナジオンの両方は、多くのCAMで血管形成の部分的阻害を誘導したが、非毛細管細胞中の壊死の若干の証拠があり、細くなる膜は、これらの化合物の一般化した細胞障害性を示す。対照PCLペレット (薬剤無し) で処理したCAMは、血管系の完全な成長を示した。

【0119】

【表2】

表2：トポイソメラーゼインヒビターの血管形成活性

各列の数字は、卵の数（CAM）を示し、血管形成の阻害無し、部分的阻害、または最大の阻害を示す。

薬剤／濃度	抗血管形成活性		
	無し (スコア＝0)	部分的 (スコア1～2)	最大 (スコア＝3)
エトポシド4.0%	2	5	-
エトポシド8.0%	-	5	-
エトポシド15.0%	-	9	4
エトポシド-MEPEG 10.0%	-	8	1
ドキソルビシン 0.5%	-	5	-
ドキソルビシン 2.0%	1	20	-
ドキソルビシン 4.0%	-	4	-
ドキソルビシン 5.0%	-	3	-
β ラパコン 1.0%	4	2	-
β ラパコン 4.0%	4	11	6
β ラパコン 6.0%	-	10	-
β ラパコン-MEPEG 4%	-	7	-
プルムバギン 1.0%	-	壊死	-
メナジオン 2.0%	-	壊死	-
対照	41	-	-

このデータは、抗炎症治療におけるこれらのトポイソメラーゼインヒビターの抗血管形成可能性を証明し、ポリマー性徐放製剤は、プルムバギン以外に不当な毒性を誘導することなく薬剤の治療上有効な濃度を放出する有効な方法であることを示す。

【0120】

実施例9. ポリ（L-乳酸）微小球中のカンプトテシンとプルムバギン

カンプトテシン（Sigma）を、ポリ（L-乳酸）（分子量2K、Polysciences）の5%（w/w）溶液中に、種々の比の薬剤対ポリマー（0.5：100～8：100（w/w））で溶解した。これらの各溶液10mlを、500rpmでオーバーヘッド攪拌しながら、2.5%（w/v）のポリビニルアルコール（PVA、分子量13～21K、Aldrich）溶液100ml中

にピペットで加えた。2時間攪拌後、PVA/微小球懸濁液を、90 μm 次に50 μm の篩いに注いで、微小球の50~90 μm 画分を集めた。次に、これらの微小球を蒸留水で3回洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した球を高収率で得た（最初のポリマーの50%を越える分を、50~90 μm のサイズ範囲の微小球として回収した）。しかし高負荷値（例えば、1 : 10より大きい 薬剤 : ポリマー）では、微小球は球を形成せず、変形して凝集した。封入効率は、1 mlのジクロロメタン中に微小球を溶解し、薬剤を60/40(v/v)アセトニトリル水混合液中に抽出し、370nmの可視吸光度の分析により測定した。ポリマー中の薬剤の封入効率は、初期の薬剤対ポリマー比で変化し、比率が高いと高レベルの封入が得られた。

【0121】

カンプトテシン充填微小球10mgを、16mlのキャップ付きガラス試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）15ml中に入れて、微小球からの薬剤放出の速度を測定した。n=4。これらの試験管を、8rpmで37°Cで規定の時間転倒させた。次に、試験管を2000×gで5分間遠心分離した。上清を取り、1 mlのジクロロメタンを振盪しながら加えた。新鮮なPBSを微小球に加え、試験管を転倒させながら、37°Cのオープンに戻した。水相を捨て、DCM（カンプトテシンの多い相）を窒素下で乾燥させた。次に、乾燥したカンプトテシンを、1 mlのアセトニトリル/水/DMSO溶媒（それぞれ、80 : 15 : 5 混合物）に溶解した。この溶液中のカンプトテシンの濃度を、C18 HPLC法により、Waters Millenium HPLC装置（条件：移動相；77%TEAバッファ（TEA：1 %トリエチルアミン水溶液、pHは氷酢酸で5.5に調整した）から23%アセトニトリル、流速：1 ml/分、C18ノバパックカラム、370nmで検出）を使用して測定した。微小球からのカンプトテシンの放出プロフィールを、図7に示す。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。カンプトテシンのこれらの剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤の急速分解性ポリマー性微小球製剤である。

【0122】

プルムバギン（Sigma）を、ポリ（L-乳酸）（分子量2K、Polysciences）の5%（w/w）溶液中に溶解して、薬剤対ポリマーが1 : 10（w/w）の最終比を得た。この溶液10mlを、500rpmでオーバーヘッド攪拌しながら、2.5%（w/v）のポリビニルア

ルコール (PVA、分子量13~21K、Aldrich) 溶液100ml中にピペットで加えた。2時間攪拌後、PVA/微小球懸濁液を、90 μm 次に50 μm の篩いに注いで、微小球の50~90 μm 画分を集めた。次に、これらの微小球を蒸留水で3回洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した球を、最初のポリマーの50%を越える高収率で得て、50~90 μm のサイズ範囲の微小球として回収した。微小球は、濃い黄色で、薬剤プルムバギンの高い封入効率を示していた。封入効率は、1 mlのジクロロメタン中に微小球を溶解し、薬剤を60/40(v/v)アセトニトリル水混合液中に抽出し、420nmの可視吸光度の分析により測定した。ポリマー中の薬剤の封入効率は、80%であった。

【0123】

プルムバギン充填微小球10mgを、1 mlのキャップ付きエッペンドルフ試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) (pH7.4) 1 ml中に入れて、微小球からのプルムバギン放出の速度を測定した。n = 3。これらの試験管を、8rpmで37℃で規定の時間転倒させた。次に、試験管を5000×gで10秒間遠心分離した。420nmで放出薬剤について上清を測定し、次に廃棄した。次に微小球に1 mlの新鮮なバッファを加え、試験管を転倒させながら37℃で再インキュベートした。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。プルムバギンのこれらの剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤の急速分解性ポリマー性微小球製剤である。

【0124】

実施例10. 架橋ヒアルロン酸フィルム中のカンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、 β ラパコンおよびプルムバギン

ヒアルロン酸 (ナトリウム塩、医薬等級、Lifecore scientific) を、4 mlの水に36mg溶解した。ここに、4 mgのグリセロールを加え、混合物をボルテックス混合した。架橋剤 (水溶性カルボジイミド: EDAC, Sigma) を、最終濃度2 mMで加え、ボルテックス混合した。薬剤 (カンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、 β ラパコンまたはプルムバギン) を、1 mg/mlでエタノールに溶解し、400 μl のこの溶液を4 mlのヒアルロン酸溶液中にピペットで入れ、ボルテックス混合した。次に、4 mlのヒアルロン酸-薬剤懸濁液4 mlのすべてを、直径2.5cmの

プラスチックペトリ皿に注ぎ、37℃のオープンに入れて一晚乾燥した。次に、乾燥したフィルムをペトリ皿から取り出した。これらのフィルムは約50 μm の厚さであり、可撓性があり、薬剤をフィルム内に均一に分散していた。

【0125】

これらのフィルムからの薬剤の放出速度を測定するために、各フィルムの5mgの切片を10mlのPBSに入れ、ステンレスの篩で重しをした。5mlのn-オクタノールをPBSの上に注ぎ（混ざらない）、試験管を、10rpmで攪拌しながら37℃の環状インキュベーターに入れた。フィルムから薬剤が放出されるにつれて、濃度勾配がn-オクタノール中に確立され、薬剤は容易にn-オクタノールに分配された。次に、カンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、 β ラパコン、またはブルムバギンについて、それぞれ370nm、222nm、256nm、254nm、および420nmで吸光度を測定することにより、n-オクタノール中で各薬剤の濃度を定量した。各薬剤の放出曲線を図8に示す。これらのフィルムは、これらの薬剤のそれぞれについて、可撓性、ムコ接着性、生体適合性、生分解性制御放出製剤である。

【0126】

実施例11. エチレン酢酸ビニルフィルム中のカンプトテシン

499mg、495mg、または450mgのエチレン酢酸ビニル（EVA、分子量約50K、Poly sciences）を有するカンプトテシン（Sigma）の1、5mgまたは50mgのサンプルを、10mlのジクロロメタンに溶解した。200 μl の溶液を、直径1cmのテフロン（登録商標）ディスクにピペットで入れ、一晚乾燥させて、100 μm のおよその厚さを有する10mgのフィルムを得た。フィルムを一晚乾燥させて（溶媒蒸発）、フィルム中に薬剤の結晶の証拠のある薄い着色された弾性フィルムを作成した。

【0127】

フィルムの5mgの切片を、16mlのキャップ付きガラス試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）15ml中に入れて、フィルムからの薬剤放出の速度を測定した。n=4。これらの試験管を、8rpmで37℃で規定の時間転倒させた。次に、試験管を2000 \times gで5分間遠心分離した。上清を取り、1mlのジクロロメタンを振盪しながら加えた。新鮮なPBSを元の試験管中でフィルムに加え、試験管を転倒させながら、37℃のオープンに戻した。水相を捨て、カンプトテシンの多

い相を窒素下で乾燥させた。次に、乾燥したカンプトテシンを、1mlのアセトニトリル/水/DMSO溶媒（それぞれ、80：15：5混合物）に溶解した。この溶液中のカンプトテシンの濃度を、C18 HPLC法により、Waters Millenium HPLC装置（条件：移動相；77%TEAバッファ（TEA：1%トリエチルアミンの水溶液、pHは氷酢酸で5.5に調整した）から23%アセトニトリル、流速：1ml/分、C18ノバパックカラム、370nmで検出）を使用して測定した。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。カンプトテシンのこれらのフィルム製剤は、カンプトテシンの、可撓性、非分解性、生体適合性、制御放出剤形である。

【0128】

実施例12. エチレン酢酸ビニルフィルム中のエトポシド、ドキソルビシンまたはβラパコン

98mgまたは95mgのエチレン酢酸ビニル（EVA、分子量約50 K、Polysciences）とともに2mgのエトポシドまたはドキソルビシン（または、5mgのβラパコン）を含有するサンプルを、2mlのジクロロメタンに溶解した。200μlの溶液を、直径1cmのテフロンディスクにピペットで与え、一晚乾燥させて、100μmのおよその厚さを有する10mgのフィルムを得た。フィルムを一晚乾燥させて（溶媒蒸発）、フィルム中に薬剤の結晶の証拠の無い薄い着色された弾性フィルムを作成した。

【0129】

フィルム10mgを、2mlのキャップ付きエッペンドルフ試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）1.8ml中に入れて、フィルムからの薬剤放出の速度を測定した。n = 3。これらの試験管を、8rpmで37℃で規定の時間転倒させた。次に、試験管を2000×gで10秒間遠心分離した。上清を、エトポシド、βラパコン、およびドキソルビシンについて、それぞれ222nm、256nm、または254nmで、放出された薬剤について測定した。次に、フィルムに1.8mlの新鮮なバッファを加え、試験管を転倒させながら37℃で再インキュベートした。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。これらの薬剤の剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤エトポシド、ドキソルビシン、またはβラ

パコンのゆっくり分解する注入可能なペースト製剤である。

【0130】

実施例13. エチレン酢酸ビニルフィルム中のプルムバギン

5mgのプルムバギン (Sigma) と95mgのエチレン酢酸ビニル (EVA、分子量約50 K、Polysciences) を、2mlのジクロロメタンに溶解した。500 μ lの溶液を、2.5cmのテフロンディスクにピペットで与え、一晚乾燥させて、100 μ mのおよその厚さを有する25mgのフィルムを得た。フィルムは、薬剤の結晶の証拠の無い薄い黄色であり、薬剤が固体ポリマー中で溶液を形成したことを示している。

【0131】

フィルム25mgを、16mlのキャップ付きガラス試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) (pH7.4) 15ml中に入れて、フィルムからの薬剤放出の速度を測定した。n = 3。これらの試験管を、8rpmで37°Cで規定の時間転倒させた。次に、試験管を2000 \times gで10秒間遠心分離した。上清を、420nmで、放出された薬剤について測定した後に捨てた。次に、フィルムに15mlの新鮮なバッファーを加え、試験管を転倒させながら37°Cで再インキュベートした。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。プルムバギンのこの剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤の急速に分解する弾性フィルムフィルム製剤である。

【0132】

実施例14. ポリカプロラクトンペースト中のカンプトテシン

カンプトテシン (Sigma) をポリカプロラクトン (PCL、Bermingham polymers、分子量54K) 中に、1 : 5または1 : 10(w/w)の比で、60°Cで、スパーテルで摩砕して、すべての薬剤が溶液になるまで混合した。ある製剤では、熔融状態で60°Cにて混合して、20% (w/w)のメトキシポリエチレングリコール (MePEG、Union Carbide、分子量350) を添加して希釈した。PCL (=/- MePEG) 中に混合した薬剤の量は、10%または20% (ポリマーに対するw/w) であった。次にこれらの混合物をピペットで1mlのプラスチックシリンジに取り、冷却した。この製剤は、18ゲージ針で56°Cで注入できた。MePEGを加えると、ペーストが低温 (約50°C) で熔融し、針で注入することが容易になり、より長い固化時間が得られ、37°Cでもろくない固体インプラントが形成される。

【0133】

ペーストからのカンプトテシンの放出速度を測定するために、30mgのペーストを、16mlのキャップ付きガラス試験管の基部に注入した。ペーストを試験管中で固化させ、15mlのPBS (pH7.4) を試験管に加えた。試験管を37℃で転倒させた。規定の時間に、試験管を2000×gで5分間遠心分離した。上清を取り、1mlのジクロロメタンを振盪しながら上清に加えた。新鮮なPBSを、元の試験管中の固化したペーストに加え、これを転倒させながら、37℃のオープンに戻した。水相を捨て、カンプトテシンの多い相を窒素下で乾燥させた。次に、乾燥したカンプトテシンを、1mlのアセトニトリル/水/DMSO溶媒（それぞれ、80:15:5混合物）に溶解させた。この溶液中のカンプトテシンの濃度を、C18 HPLC法により、Waters Millenium HPLC装置（条件：移動相；77%TEAバッファ（TEA：1%トリエチルアミン水溶液、pHは氷酢酸で5.5に調整した）から23%アセトニトリル、流速：1ml/分、C18ノバパックカラム、370nmで検出）を使用して測定した。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。PCLへのMePEGの添加は、10%および20%カンプトテシン充填フィルムの両方で、カンプトテシンの放出速度を加速した。カンプトテシンのこれらのペースト製剤は、カンプトテシンの、注入可能な、生分解性、生体適合性、制御放出剤形である。ペーストの物性とペーストからの薬剤の放出速度はまた、MePEGの添加により調節される。

【0134】

実施例15. ポリカプロラクトンペースト中のエトポシド、ドキソルビシン、またはβラパコン

エトポシド、ドキソルビシン (Sigma) およびβラパコン (Calbiochem) のサンプルを、ポリカプロラクトン (PCL, Bermingham polymers、分子量54K) 中に60℃で、スパテルで摩砕して、またはすべての薬剤が溶液になるまで、混合した。PCLに混合した薬剤の量は、エトポシド、ドキソルビシン、およびβラパコンについてそれぞれ2%、5%、または8%（ポリマーに対するw/w）であった。次にこれらの混合物を、ピペットで1mlのプラスチックシリンジに入れ、冷却させた。この製剤は、18ゲージ針で56℃で注入できた。

【0135】

PCLペーストからの薬剤放出を測定するために、溶融ペーストの10mgのアリコート、2mlのエッペンドルフ試験管の基部に注入し、冷却し硬化させた。1.8mlのPBS (pH7.4) を加え、試験管にキャップをし、37℃オープン中で転倒させた。規定の時間に、試験管を取り出し、上清に放出された薬剤の量を、エトポシド、ドキソルビシン、およびβラパコンについて、それぞれ222nm、254nm、または256nmの吸光度により分析した。次にPBSを捨て、新鮮なPBSで置換した。全ての薬剤の放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。これらの薬剤のこの剤形は、エトポシド、ドキソルビシン、またはβラパコンを制御放出する、薬剤の、生体適合性、生分解性、注入可能な製剤である。

【0136】

実施例16. ポリカプロラクトンペースト中のブルムバギン、メナジオン、およびジュグロン

ブルムバギン、ジュグロン、およびメナジオン (Sigma) の10mgのサンプルを、90mgのポリカプロラクトン (PCL, Bermingham polymers、分子量54 K) 中に60℃で、スパーテルで摩砕して、またはすべての薬剤が溶液になるまで、混合した。次にこれらの混合物を、ピペットで1mlのプラスチックシリンジに入れ、冷却させた。この製剤は、18ゲージ針で56℃で注入できた。

【0137】

PCLペーストからの薬剤放出を測定するために、溶融ペーストの30mgのアリコートを、15mlのガラス試験管の基部に注入して、冷却し硬化させた。15mlのPBSを試験管に加え、試験管にキャップをし、37℃オープン中で転倒させた。規定の時間に、試験管を取り出し、放出された薬剤の量を、420nmの吸光度により分析した。次にPBSを捨て、新鮮なPBSで置換した。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。これらの剤形は、ブルムバギン、ジュグロン、またはメナジオンを制御放出する、薬剤の、生体適合性、生分解性、注入可能な製剤である。

【0138】

実施例17. ポリマーペースト中のカンプトテシンまたはプルムバギン

ポリ（乳酸）とポリエチレングリコール（TB、Angiotech Pharmaceuticals、バンクーバー、ブリティッシュコロンビア州）とから作成した36mgのトリブロックコポリマーを、54mgのメトキシポリエチレングリコール（MePEG、Union Carbide、分子量350）と50℃で混合した。この混合物に10mgのカンプトテシン（Sigma）を加え、すべての薬剤がポリマー中に均一に分散するまで、50℃で5分間攪拌した。次にペーストを1mlのプラスチックシリンジに取り、冷却した。室温では、このペーストは、23ゲージ針で注入できた。37℃の水性培地中にて、in vitroで、またはマウスで皮下注入後、MePEGは溶解し、ペーストは1時間以内に固化してろう様のインプラントになった。ペーストからの薬剤放出を測定するために、15mgのこのペーストを、20mlのガラスシンチレーションバイアル中で球形の液滴として置いた。5mlの冷PBS（pH7.4）を加え、4℃で1時間ペーストを硬化させた。PBSの上に5mlのn-オクタノールを注ぎ、バイアルにキャップをし、37℃のオープンに入れた。規定の時間に、n-オクタノール中で放出された薬剤の量を、370nmの吸光度により定量した。ペーストからのカンプトテシンの放出プロフィールを図9に示す。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。カンプトテシンのこの剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤の、生体適合性、生分解性、注入可能な製剤である。

【0139】

このペーストからのプルムバギンの放出プロフィールは、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出により特徴づけられた。プルムバギンのこの剤形は、プルムバギンを制御放出する、薬剤の、生体適合性、生分解性、注入可能な製剤である。

【0140】実施例18. キトサンフィルム中のカンプトテシンとプルムバギン

10mgのカンプトテシン（Sigma）を1.2mlのジメチルスルホキシドに溶解し、次に2%酢酸中の2.5%のキトサン（Fluka scientific、低分子量）溶液4ml中にピペットで入れた。次にこの混合物をスパーテラで5分間攪拌して、沈殿した薬剤をキトサン溶液中に均一に懸濁させた。次に、この粘性の混合物の4mlを、2.5c

mのプラスチックペトリ皿に注ぎ、37℃で一晩乾燥させた。キトサンは乾燥して薄膜になり、これをペトリ皿から取り出した。これらのフィルムは適度に可撓性であり、厚さ約35 μ mであり、薬剤結晶は、10%（キトサンに対して）の濃度でキトサンマトリックス中に均一に分散していた。これらのキトサンフィルムからの薬剤放出を測定するために、20mg片を、キャップ付き試験管中の10mlのPBS（pH7.4）中に入れ、規定の時間37℃で転倒させた。フィルムからPBS中に放出された薬剤の量を、370nmの吸光度により定量した。薬剤の濃度が0.3mg/mlに達したとき、試験管中の沈殿物の条件を維持するために、これらの試験でPBS上清を置換した。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。カンプトテシンのこの剤形は、薬剤を制御放出する、カンプトテシンの、生体適合性、ムコ接着性の製剤である。

【0141】

これらのフィルムからのプルムバギンの放出プロフィールは、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出により特徴づけられた。プルムバギンのこの剤形は、プルムバギンを制御放出する、プルムバギンの、生体適合性、ムコ接着性の製剤である。

【0142】

実施例19. ポリ（乳酸-グリコール酸）微小球中のエトポシド、ドキソルビシン、および β ラパコン

エトポシド（Sigma）、ドキソルビシン（Sigma）、および β ラパコン（Calbiochem）のサンプルを、ポリ（L-乳酸）（分子量2K、Polysciences）の5%（w/v）溶液に溶解して、薬剤対ポリマーが1：40（w/w）（ β ラパコン）または1：100（w/w）（エトポシドとドキソルビシン）の最終比を得た。各溶液10mlを、500rpmでオーバーヘッド攪拌しながら、2.5%（w/v）のポリビニルアルコール（PVA、分子量13~21K、Aldrich）溶液100ml中にピペットで加えた。2時間攪拌後、PVA／微小球懸濁液を、90 μ m次に50 μ mの篩いに注いで、微小球の50~90 μ m画分を集めた。次に、これらの球を蒸留水で3回洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した球を高収率で得た（最初のポリマーの50%を超える分を、50~90 μ mのサイズ範囲の微小球として回収した）。封入効率は、1mlのジクロロメタン中に微小球を

溶解し、薬剤を60/40(v/v)アセトニトリル水混合液中に抽出し、 β ラパコン、エトポシド、およびドキソルビシンについて、それぞれ256nm、222nm、および254nmの可視吸光度の分析により測定した。ポリマー中の薬剤の封入効率は、 β ラパコン、エトポシド、およびドキソルビシンについて、それぞれ97%、68%、および95%であり、全て良好であった。

【0143】

薬剤充填微小球10mgを、2mlのキャップ付きエッペンドルフ試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS) (pH7.4) 1.8ml中に入れて、これらの微小球からの薬剤放出の速度を測定した。n = 3。これらの試験管を、8rpmで37℃で規定の時間転倒させた。次に、試験管を5000×gで10秒間遠心分離した。256、222、および254nmでそれぞれ放出薬剤について上清を測定した後に廃棄した。次に微小球に1.8mlの新鮮なバッファーを加え、試験管を転倒させながら37℃で再インキュベートした。微小球からのこれらの薬剤の放出プロフィールを図18に示す。放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。これらの薬剤の剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤の急速分解性ポリマー性微小球製剤である。

【0144】

実施例20. ポリカプロラクトン微小球中のブルムバギン、ジュグロン、およびメナジオン

ブルムバギン、ジュグロン、およびメナジオン (Sigma) のサンプルを、ポリカプロラクトン (PCL、Birmingham polymers、分子量54K) の5% (w/v) 溶液に溶解して、薬剤対ポリマーが1 : 50 (w/w) の最終比を得た。各溶液10mlを、500rpmでオーバーヘッド攪拌しながら、2.5% (w/v) のポリビニルアルコール (PVA、分子量13~21K、Aldrich) 溶液100ml中にピペットで加えた。2時間攪拌後、PVA/微小球懸濁液を、90 μ m次に50 μ mの篩いに注いで、微小球の50~90 μ m画分を集めた。次に、これらの球を蒸留水で3回洗浄し、真空下で乾燥した。乾燥した球を高収率で得た (ジュグロン、メナジオン、およびブルムバギンについてそれぞれ59%、50%、および54%が50~90 μ mのサイズ範囲)。薬剤の封入効率を、1mlのジクロロメタン中に微小球を溶解し、薬剤を60/40(v/v)アセトニトリル水混

合液中に抽出し、プルムバギン、ジュグロン、およびメナジオンについて、それぞれ420nm、422nm、および340nmの可視吸光度で分析することにより測定した。ポリマー中の薬剤の封入効率は、ジュグロンとプルムバギンについて85%であり、メナジオンについて73%であった。

【0145】

薬剤充填微小球10mgを、1mlのキャップ付きエッペンドルフ試験管中のリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）1ml中に入れて、これらの微小球からの薬剤放出の速度を測定した。n = 3。これらの試験管を、8rpmで37℃で規定の時間転倒させた。次に、試験管を5000×gで10秒間遠心分離した。420nmまたは340nmで放出薬剤について上清を測定した後に廃棄した。次に微小球に1mlの新鮮なバッファーを加え、試験管を転倒させながら37℃で再インキュベートした。微小球からの薬剤放出は、初期の薬剤の突発放出およびその後の遅い持続的な放出に特徴があった。プルムバギン、ジュグロン、またはメナジオンの剤形は、薬剤を制御放出する、薬剤のゆっくり分解するポリマー性微小球製剤である。

【0146】

実施例21. ラット頸動脈モデルの再狭窄に及ぼすカンプトテシンおよび他のトポイソメラーゼインヒビターの作用

この再狭窄のモデルでは、バルーンカテーテルを使用して、ラットの頸動脈の管腔への傷害を誘導した。この傷害は、再狭窄に特徴的な広範な内膜肥厚と管腔の狭窄を引き起こす。抗再狭窄剤としての薬剤の作用を測定するために、ポリマー剤形の薬剤を動脈の外側に適用する（血管周囲適用）。

【0147】

体重400g～500gのウィスターラットを、ハロタンで麻酔した。気管を縦に切開し、左頸動脈を露出させた。外部頸動脈の周りに2つの結紮糸を置き、この間で動脈切開を行った。2フレンチフォガーティバルーンカテーテルを外部頸動脈に導入し、左の総頸動脈に押し込み、食塩水でバルーンを膨らませた。該カテーテルを頸動脈の全長に沿って3回行き来させて、血管を伸ばし、内皮細胞をはく離させた。該カテーテルを取り出し、外部頸動脈の上で結紮糸を結んだ。1%、10%、および20%のカンプトテシンを充填したエチレン酢酸ビニル（EVA）フィル

ム ($0.8 \times 0.8 \times 0.015 \text{ cm}$) ならびにカンプトテシンの無い対照EVAフィルムを、総頸動脈の末端セグメントの周りに包み、同じ場所をプロリン6-0で縫い合わせた。次に傷を閉じ、動物を回復させた。14日間後、ラットを屠殺し、10%緩衝化ホルムアルデヒドを用いて100mmHgで圧力灌流した。両方の頸動脈を採取し、組織学的分析のために処理した。傷害した左頸動脈のインプラントの内と外および対照の右頸動脈の対応するレベルを、2mmずつ連続的断片を切り取った。切片をヘマトキシリン-エオシン、およびMovat染色で染色し、コンピューターによる形態測定分析のためにデジタル化して、管腔狭窄と内膜肥厚を定量した。

【0148】

対照群 (0%カンプトテシン) のラットは、再狭窄を示す内膜領域の増大 (内膜肥厚) を示した。内膜肥厚は、カンプトテシン充填EVAフィルムにより、用量依存的に阻害された。完全な阻害は、20%充填で達成され、部分的阻害は、0.2%、1%、および10%充填フィルムで達成された。対照群のラットの調べた動脈は、再狭窄に特徴的な管腔領域の負方向の変化 (すなわち、管腔は小さくなる) があった。0.2% (EVAに対してw/w) という低いカンプトテシン濃度が、50%を越える管腔狭窄を阻害するのに十分な薬剤を放出した。0.2%を越えるカンプトテシンの濃度はすべて、管腔狭窄をほとんどゼロまで減少させた。このデータは、動脈の血管周囲に適用したポリマーフィルムからの制御薬剤放出の有効性を証明している。

【0149】

対照群 (0%薬剤) のラットは、再狭窄を示す内膜領域の増大 (内膜肥厚) を示した。内膜肥厚は、1%および5%エトポシド充填EVAフィルムの血管周囲適用により、約75%阻害された。管腔狭窄の同様の減少は、エトポシド処理ラットで観察された。2%充填 (EVAに対するw/w) のドキソルビシンを充填したEVAフィルムは、内膜肥厚と管腔狭窄を完全に阻害した。エトポシドまたはドキソルビシンを充填したフィルムは、周りの組織に壊死や毒性を誘導しなかった。このデータは、動脈の血管周囲に適用したポリマーフィルムから制御薬剤放出されたトポイソメラーゼ2インヒビターの抗再狭窄活性の有効性を証明している。しかし、プルムバギンまたはジュグロンで処理したラットは、薬剤を動脈の血管周囲に

適用すると、過度の毒性を示した（しかしメナジオンはそうではなかった）。

【0150】

実施例22. ラット頸動脈の血管周囲にトポイソメラーゼインヒビターを送達するための注入可能なポリマーペーストの使用

体重400g～500gのウィスターラットを、ハロタンで麻酔した。気管を縦に切開し、左頸動脈を露出させた。左の総頸動脈の周りの結合組織にはふれなかった。外部頸動脈の周りに2つの結紮系を置き、この間で動脈切開を行った。2フレンチフォガーティバルーンカテーテルを外部頸動脈に導入し、左の総頸動脈に押し込み、食塩水でバルーンを膨らませた。カテーテルを頸動脈の全長に沿って3回行き来させて、血管を伸ばし、内皮細胞をはく離させた。バルーンを取り出し、外部頸動脈の上で結紮系を結んだ。ポリマーペースト（40%トリブロック（Angiotech Pharmaceuticals）と60%メトキシポリエチレングリコール（MePEG350）中のカンプトテシン（1%充填）または担体ペースト単独を、24G血管カテーテルを通して、総頸動脈の末端セグメントと周りの結合組織の間に注入した。典型的には0.1～0.2mlのペーストを動脈の周りに4回の注入で適用し、約1cmの長さの血管の全周囲を覆った。次に傷を閉じ、動物を回復させた。

【0151】

この方法を使用して、種々の用量のポリマー剤形の抗再狭窄化合物であるカンプトテシンを、（動脈へのポリマーフィルムの適用に必要されるような）動脈を完全に露出する必要無く、傷害した動脈の血管周囲に適用した。ラットはこの適用方法を充分耐え、いずれのラットでも副作用は認められなかった。本例は、ポリマー剤形のトポイソメラーゼインヒビターを適用する非侵襲的方法を示す。この特定の例において、一部侵襲的手術を使用して、バルーンカテーテルを適用した。カテーテルは、離れた位置から適用でき、ペーストは、傷害動脈を外科的に露出することなく、血管カテーテルを用いて傷害動脈に適用することができる。

【0152】

実施例23. 外科的癒着を治療するためのトポイソメラーゼインヒビター

ラット盲腸一側壁癒着モデルを使用して、以下の化合物の1つを充填した架橋ヒアルロン酸（HA）ポリマーフィルムの有効性を試験した：カンプトテシン2.5

%充填（ポリマーに対するw/w）、クルクミン10%、ドキシソルビシン2.5%、 β ラパコン5%、または充填していない薬剤無し対照。実施例10に記載の方法により、各薬剤で2~2.5cm²のフィルムを調製した。ET0滅菌し、移植手術の時、2つに分けた。擬似手術では、別の対照(separate control)としてHAフィルムの適用を省略した。

【0153】

A. 方法

手術準備

体重250~400gのSprague-Dawleyラット（雄15匹、雌15匹）をハロタン（5%）で麻酔し、1.5~2%ハロタンでノーズコーンにより維持した。無菌条件下で手術を行った。腹部の毛を剃り、消毒洗浄液で拭き、腹白線で3cm切開して開いた。大腸のすぐ反対側の腹腔領域を腸クランプで取り出し、#11メス刃を使用して、腹横筋の部分に1×1.5cmの長方形の切れ目を入れた。筋肉をピンセットで腹部側壁からはがし、小さい出血をタンポナーデで止めた。次に大腸を無菌スワブで露出させ、盲腸内容物を大腸に取り出した。盲腸の両面を、#10メス刃で、各側を45回こすり、紅斑と斑点出血を起こした。1回のこすりは、盲腸の直径（約1cm）にわたり、1.5cm盲腸の端に沿って行った。1つの例でのみ、この操作により出血が持続し、結紮が必要であった。刃での90回のこすりの後、組織の完全性を確認し、盲腸と大腸を骨盤に戻した。

【0154】

フィルムを長方形の側壁擦過傷（擬似手術の場合を除く）上に置き、傷害組織部位を覆った。次に、元の配置に置いたすりむけた盲腸を全側壁外傷とフィルムがそれで覆われるように重ねた。4つの粘着縫合を、盲腸のすりむけ部分の外の端に行い、それを長方形の傷害部位のすぐ外の無傷の腹膜側壁に固定した。腹部を2層に閉じ、筋肉内に抗生物質を投与した後、動物は意識を回復した。

【0155】

手術の8日後、動物をペントバルビタールナトリウムで安楽死させ、腹部を開いて調べた。盲腸の上および隣接する癒着を、以下の知見に従って格付けした：
0：盲腸と側壁の外傷をつなぐ癒着は無い；1：フィルム状でよじれて、ブラン

トジセクション(blunt dissection)により分離可能であった；2：盲腸と側壁をつなぐ、攻撃的プラントジセクションにより分離可能な密着性の癒着；3：盲腸を切断または引裂き／傷害無しでは分離不可能な癒着。種々の格付けが該当すると思われた場合は、小数点を割り当てた。

【0156】

B.結果

1群でn=約4匹の動物を使用して、これらの方法を2回繰り返した。すべての対照フィルム（薬剤無し）で処理した動物は、外科的癒着形成を確立し、中心は2より大きかった（平均=2.33）。カンプトテシン充填フィルムで処理した動物は全て、外科的癒着形成の兆候はほとんどなかった（平均=0.95）。ドキソルビシン充填フィルムで処理した動物は、外科的癒着形成の阻害を示し、平均スコアは1.24であった。 β ラパコン充填フィルムで処理した動物は、癒着阻害を示した（n=4）。確立された抗増殖剤（トポイソメラーゼインヒビターではない）クルクミン（10%充填）で処理したすべての動物は、癒着形成を示さなかった。

【0157】

以上の発明は、理解を明確にするために説明と例によりある程度詳細に説明したが、本発明の教示から、添付の特許請求の範囲の精神または範囲を逸脱することなく、変更や修飾が可能であることは、当業者には容易に明らかであろう。本明細書に記載のすべての特許、特許出願、および刊行物は、参照することにより本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

48時間暴露後のin vitroでの滑膜細胞と平滑筋細胞の増殖に及ぼす、カンプトテシンの作用を示すグラフである。

【図2】

(A)CPPD結晶、(B)fMLP、または(C)PMAにより誘導される好中球の化学発光に及ぼす β ラパコンの作用を示すグラフである。

【図3】

CPPD結晶またはfMLP誘導性の好中球のスーパーオキシド生成に及ぼすプルムバ

ギンの作用を示すグラフである。

【図4】

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の放出により測定した、CPPD結晶またはfMLP誘導性の好中球脱顆粒に及ぼすプルムバギンの作用を示すグラフである。

【図5】

軟骨細胞でのIL-1誘導性の遺伝子発現に及ぼすカンプトテシンの作用を示すX線フィルムスキャンを示す。

【図6】

軟骨細胞でのIL-1誘導性の遺伝子発現に及ぼすメナジオンの作用を示すX線フィルムスキャンを示す。

【図7】

微小球中の薬剤の異なる最終充填物のうちの、PLLA微小球からのカンプトテシンの放出速度を示すグラフである。

【図8】

架橋ヒアルロン酸フィルムからのカンプトテシン、エトポシド、ドキソルビシン、 β ラパコンまたはプルムバギン (1%薬剤) の放出を示すグラフである。

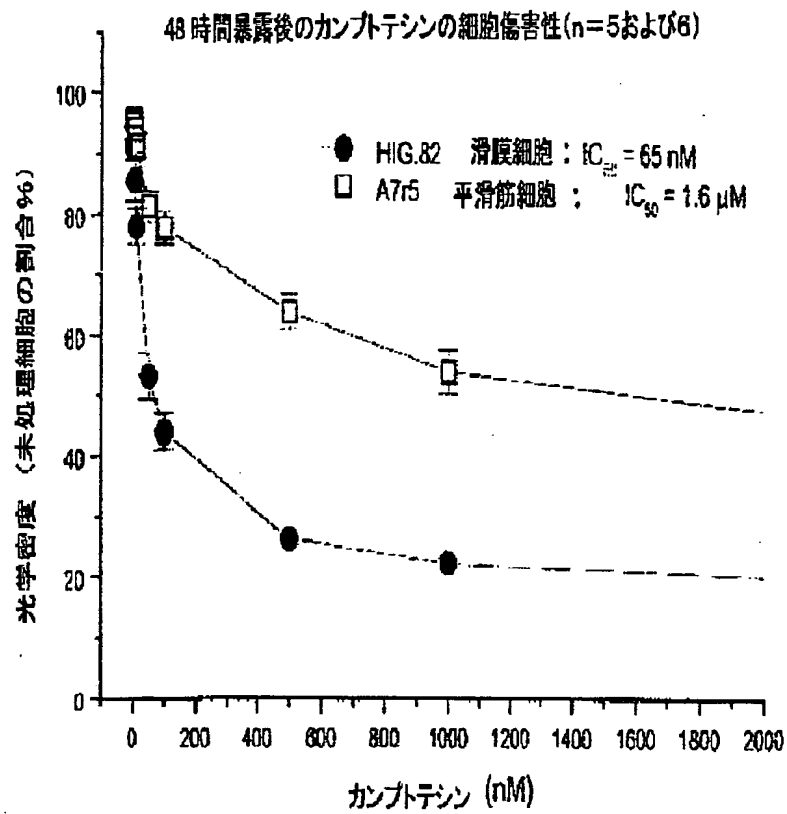
【図9】

トリブロックコポリマー/MePEG (40:60, w:w) ペーストからのカンプトテシン (10%) の放出を示すグラフである。

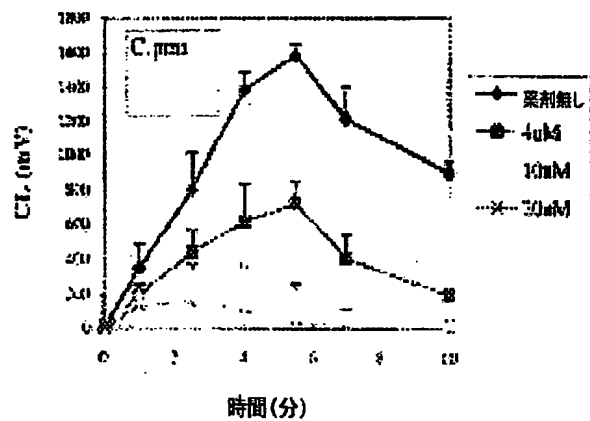
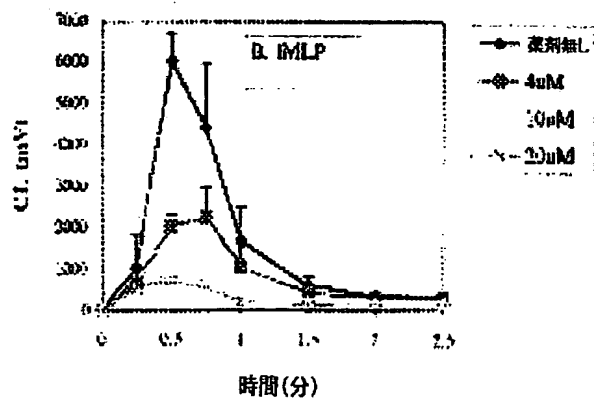
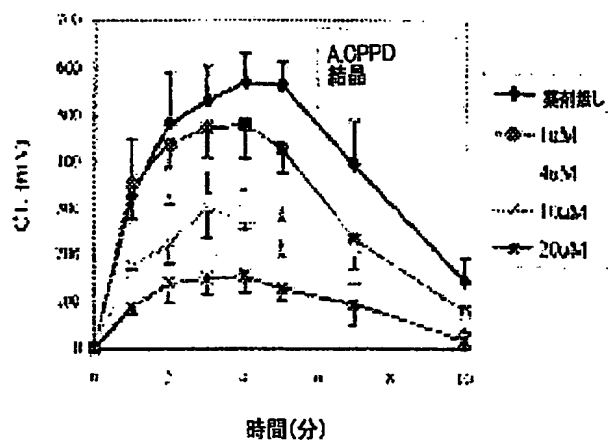
【図10】

PLGA微小球からのエトポシド、ドキソルビシン、または β ラパコンの放出を示すグラフである。

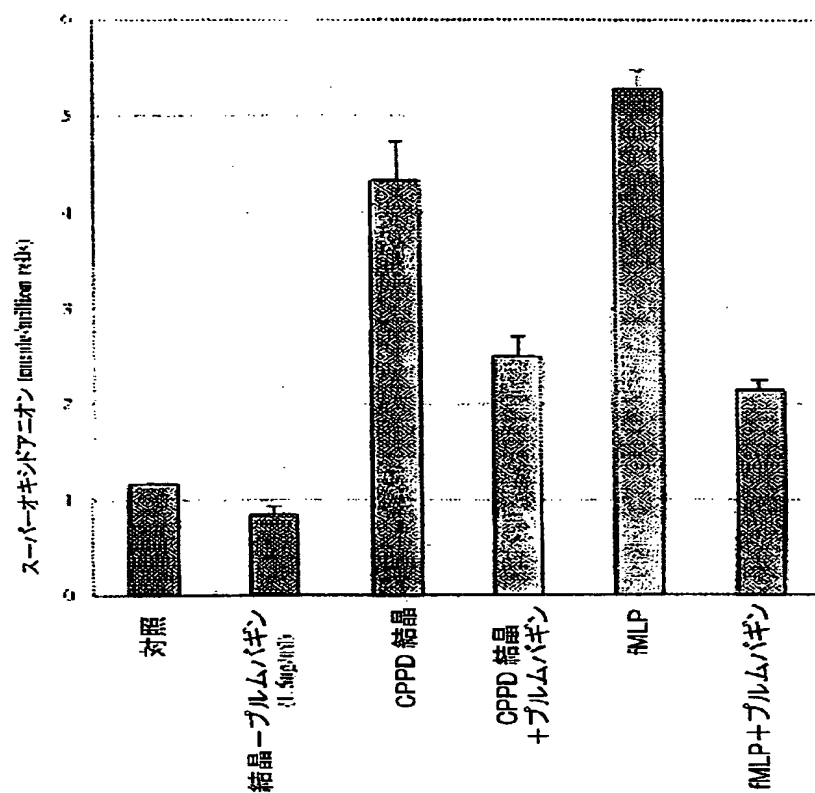
【図1】



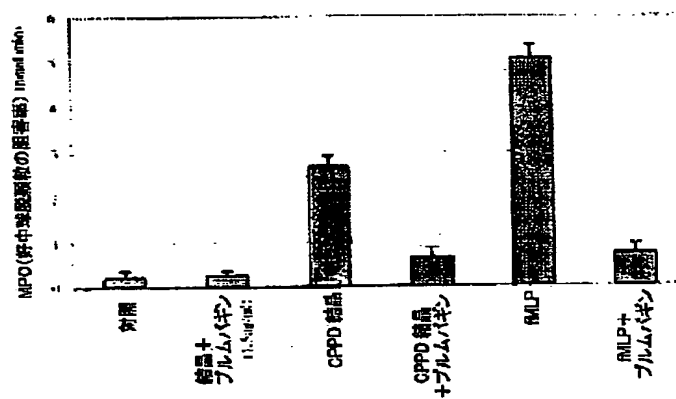
【図2】



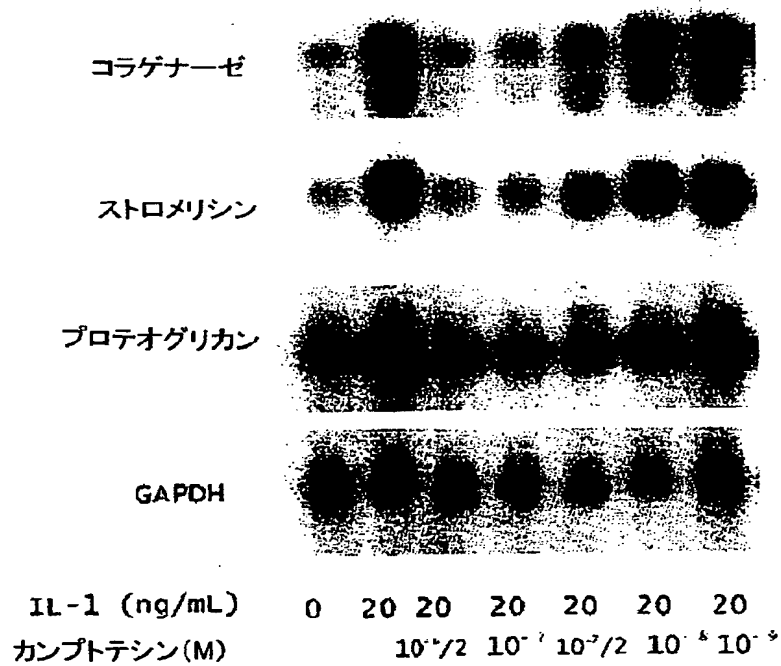
【図3】



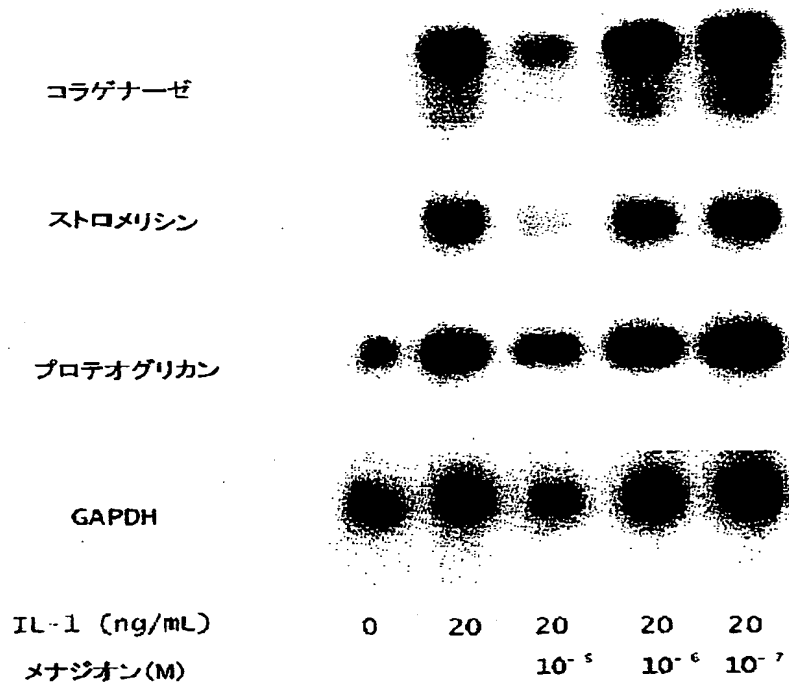
【図4】



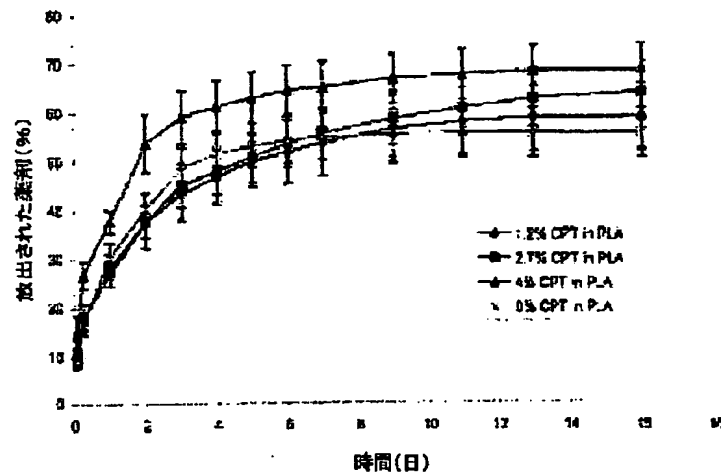
【図5】



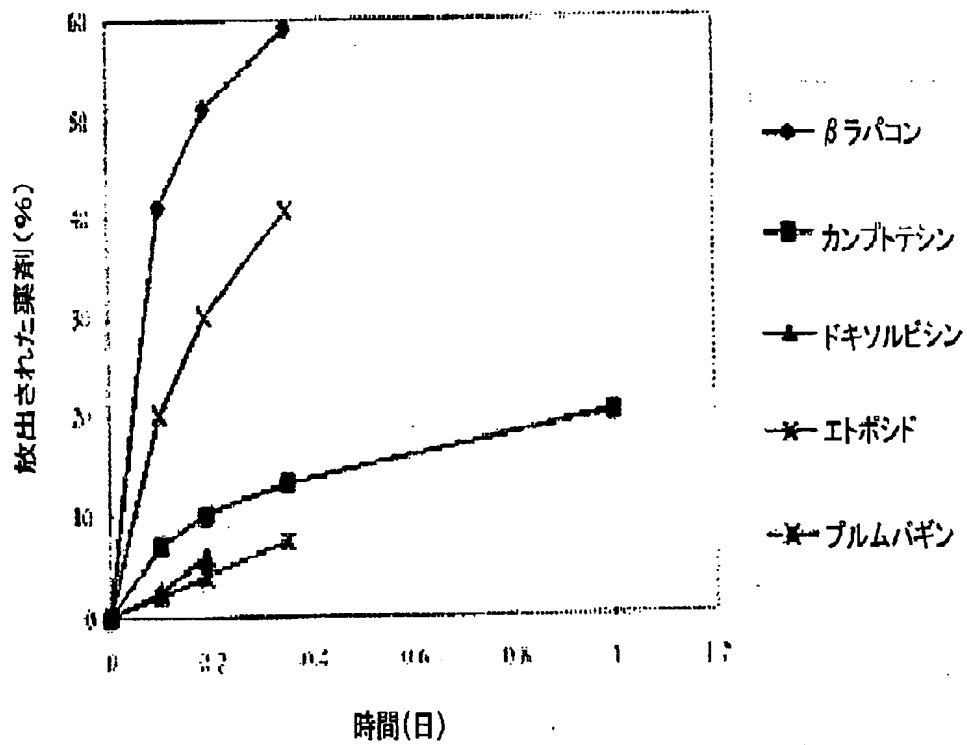
【図6】



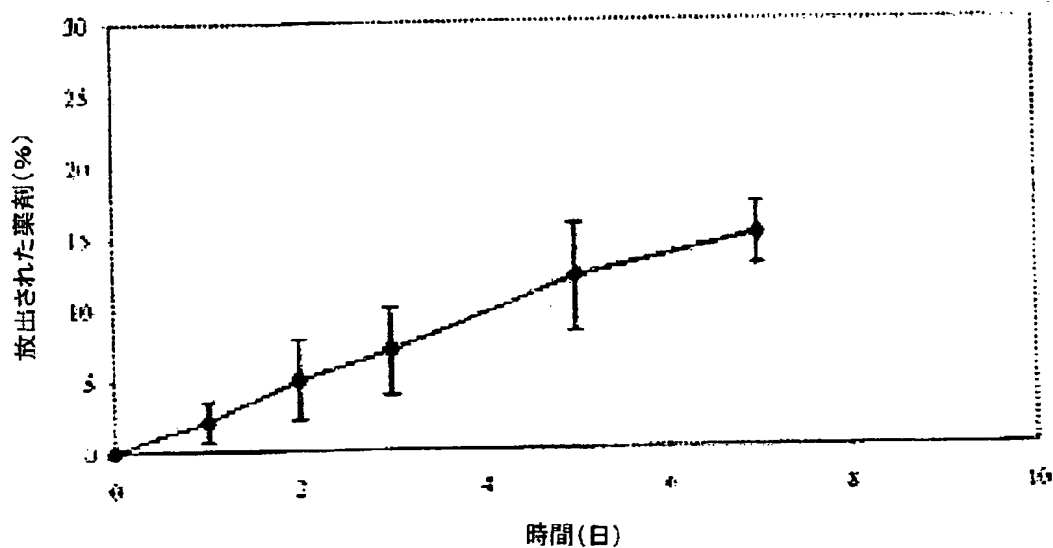
【図7】



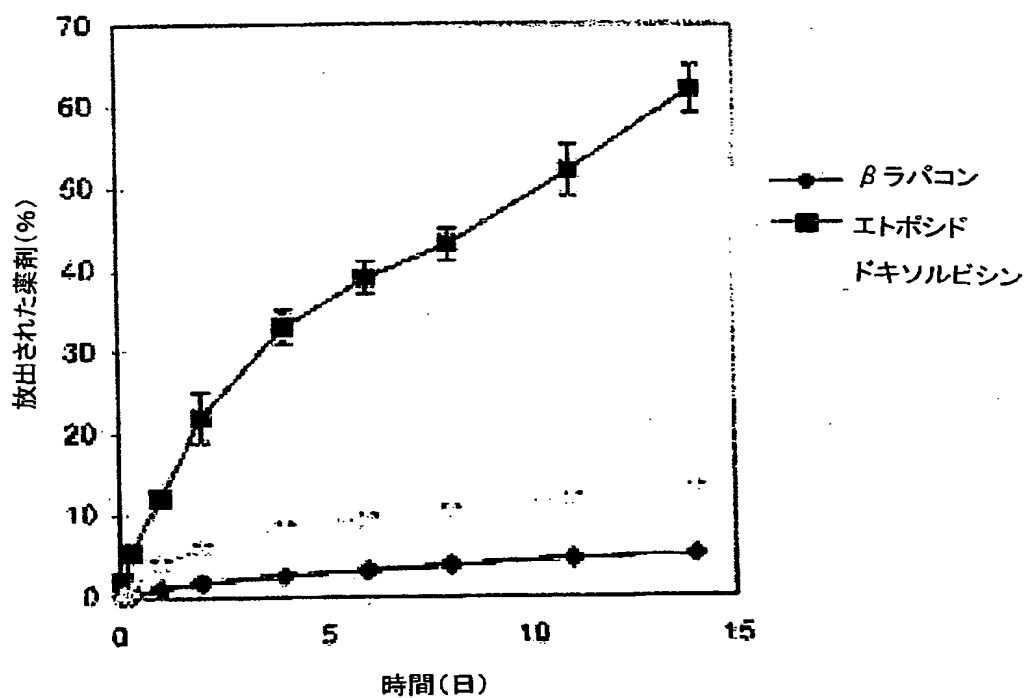
【図8】



【図9】



【図10】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/00247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/357 A61K31/365 A61P29/00 A61K31/704 A61K31/122
A61K31/475

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PITSILLIDES A A ET AL: "AMELIORATION BY MENADIONE OF THE EXPERIMENTAL CHRONIC IMMUNE ARTHRITIS IN THE RABBIT" CELL BIOCHEMISTRY AND FUNCTION, vol. 8, no. 4, 1990, pages 221-226, XP001037799 ISSN: 0263-6484 abstract	1-3, 15
X	FONTAGNE ET AL: "PROPRIETES INFLAMMATOIRES ET ANTIINFLAMMATOIRES DE DIVERSES SUBSTANCES OXYDANTES" ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHARMACODYNAMIE ET DE THERAPIE, vol. 206, 1973, pages 242-252, XP001037778 abstract	1-3, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 December 2001

Date of mailing of the international search report

30/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-2016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 01/00247

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SLOBODA A E ET AL: "STUDIES OF THE EFFECT OF MITOXANTRONE ON ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN RATS" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 40, no. 2, 1986, pages 236-243, XP001025180 ISSN: 0090-1229 the whole document	1,4,5, 11,12,15
X	NORBERG B ET AL: "EFFECTS ON BONE MARROW CELLS OF ORAL TREATMENT WITH PODOPHYLLOTOXIN DERIVATIVES IN RHEUMATOID ARTHRITIS" SCANDINAVIAN JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 14, no. 3, 1985, pages 271-275, XP001037739 ISSN: 0300-9742 abstract	1-3,15
X	DUBOIS ET AL: "DE BEHANDELING VAN MULTIPLE SCLEROSE" TIJDSCHRIFT VOOR GENEESKUNDE, vol. 53, no. 20, 1997, pages 1382-1395, XP001037773 abstract	1,4,5,15
X	VOISARD RAINER ET AL: "A prescreening system for potential antiproliferative agents: Implications for local treatment strategies of postangioplasty restenosis." INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, vol. 51, no. 1, 1995, pages 15-28, XP001037798 ISSN: 0167-5273 abstract	1,8,9
X	LIU SHING-HWA ET AL: "Inhibition of inducible nitric oxide synthase by beta-lapachone in rat alveolar macrophages and aorta." BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 126, no. 3, February 1999 (1999-02), pages 746-750, XP001087770 ISSN: 0007-1188 abstract	1,15
X	WO 99 62510 A (ANGIOTECH PHARM INC ;HUNTER WILLIAM L (CA)) 9 December 1999 (1999-12-09) page 8, line 15 - line 16	1,15

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 01/00247

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIMURA I ET AL: "MENAQUINONE VITAMIN K-2 THERAPY FOR BRONCHIAL ASTHMA PART 2 CLINICAL EFFECT OF MENAQUINONE ON BRONCHIAL ASTHMA" ACTA MEDICA OKAYAMA, vol. 29, no. 2, 1975, pages 127-136, XPO01037714 ISSN: 0386-300X abstract	1,15
X	WO 00 00238 A (QUANAM MEDICAL CORP) 6 January 2000 (2000-01-06) page 14; example 5	12,13
X,P	US 6 191 119 B1 (RUBINFELD JOSEPH) 20 February 2001 (2001-02-20) claim 4	6,7,15
X,P	US 6 281 223 B1 (LENAZ LUIGI ET AL) 28 August 2001 (2001-08-28) column 6, line 7	6,7,15
A	FROSCH P J ET AL: "ALLERGIC REACTIONS OF THE IMMEDIATE TYPE TO THE HAIR DYE HENNA" ALLERGOLOGIE, vol. 9, no. 8, 1986, pages 351-353, XPO01037738 ISSN: 0344-5062 abstract	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/CA 01/00247

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9962510	A	09-12-1999	AU WO	4025599 A 9962510 A2	20-12-1999 09-12-1999
WO 0000238	A	06-01-2000	EP WO	1087801 A1 0000238 A1	04-04-2001 06-01-2000
US 6191119	B1	20-02-2001	AU WO	7377200 A 0128542 A2	30-04-2001 26-04-2001
US 6281223	B1	28-08-2001	AU WO	3913900 A 0061187 A1	14-11-2000 19-10-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/704		A 6 1 K 31/704	4 C 1 6 7
47/30		47/30	4 C 2 0 6
A 6 1 L 29/00		A 6 1 L 29/00	B
31/00		31/00	B
A 6 1 M 29/00		A 6 1 M 29/00	
A 6 1 P 1/00		A 6 1 P 1/00	
9/10		9/10	
11/00		11/00	
17/00		17/00	
17/06		17/06	
19/00		19/00	
19/02		19/02	
25/00		25/00	
29/00		29/00	
	1 0 1		1 0 1
35/00		35/00	
37/06		37/06	
41/00		41/00	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
(72)発明者	ジャクソン, ジョン, ケイ. カナダ国 ブリティッシュ コロンビア ヴィ5ゼット 2エイチ7, バンクーバ ー, ウェスト 29ティーエイチ アヴェニ ュー 540		
(72)発明者	バート, ヘレン, エム. カナダ国 ブリティッシュ コロンビア ヴィ6エル 1エックス5, バンクーバ ー, ウェスト 28ティーエイチ アヴェニ ュー 3182		
(72)発明者	ドードウナー, スティーブン, ケイ. アメリカ合衆国 21221 メリーランド州, ボルティモア, サウス マリリン アヴェ ニュー 1272		

F ターム(参考) 4C076 AA51 AA53 AA71 AA94 BB32
CC04 EE06 EE24 EE37 EE48
FF31 FF32
4C081 AC08 AC09 BB06 CA052
CA092 CA162 CB012 CC01
CD082 CE02
4C084 AA17 MA36 MA37 MA66 MA67
MA70 NA12 ZA022 ZA392
ZA592 ZA732 ZA892 ZA962
ZB082 ZB112 ZB152 ZB262
ZC202 ZC802
4C086 AA01 AA02 CA01 CB05 EA10
MA01 MA04 MA70 NA12 ZA02
ZA39 ZA59 ZA73 ZA89 ZA96
ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZC20
ZC80
4C097 AA15 BB01 CC08 DD02 EE02
EE08 FF01 FF03
4C167 AA41 CC09 GG41
4C206 AA01 AA02 CB28 MA01 MA04
MA28 MA29 MA90 NA12 ZA02
ZA39 ZA59 ZA73 ZA89 ZA96
ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZC20
ZC80